

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-505497

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月2日

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

F I

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

Z

G 0 1 N 35/00

G 0 1 N 35/00

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願平8-509662  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995) 9月6日  
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 3月7日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US95/11333  
 (87) 国際公開番号 WO96/07917  
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 3月14日  
 (31) 優先権主張番号 08/304, 657  
 (32) 優先日 1994年9月9日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, BR, CA, CN, FI, JP, NZ

(71) 出願人 ナノゲン・インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア州  
 サンディエゴ、パシフィック・センター・  
 コート 10398番  
 (72) 発明者 ヘラー, マイケル・ジェイ  
 アメリカ合衆国92024カリフォルニア州  
 エンシニタス、ホーク・ビュー・ドライブ  
 1614番  
 (72) 発明者 トゥー, ユージーン  
 アメリカ合衆国92103カリフォルニア州  
 サンディエゴ、ラーク・ストリート3527番  
 (74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自動化された分子生物学的診断システム

(57) 【要約】

分子的診断、分析、多工程および多反応を顕微鏡的フォーマットで行うための自己アドレス可能かつ自己アセンブル微小電子的システム。能動的に制御された反応は、核酸ハイブリダイゼーション、イムノアッセイ、臨床診断および多工程組み合わせバイオポリマー合成を包含する。好ましくはグラフィックディスプレイを含むインプット/アウトプット装置を介してコントローラーはユーザーに対面する。コントローラーは電源およびインターフェースに対面していてもよく、インターフェースは個々の微小位置への選択的接続、極性逆転、および個々の電極に対する選択的電位または電流を提供する。DNA試料調製、ハイブリダイゼーション、検出およびデータ分析を行うために組み合わせられたシステムは多工程を統合する。好ましくは、荷電物質を自由電界電気泳動により輸送する。好ましくは、DNAを支持体に結合させ、例えば制限酵素により結合物質を開裂させ、次いで、開裂されたフラグメントを輸送することによりDNAの複雑さの減少を行う。能動的でプログラム可能なマトリックスデバイスは、羽を広げた形状の電氣的接続および所

望により存在してもよい特定微小位置の真下の電氣的接続を伴う四角形のマトリックスパターンを含み、高度に自動化されたDNA診断システムを形成する。

## 【特許請求の範囲】

1. 分子生物学的プロセスに適用される電子的装置であって、  
第1のほぼ平坦な表面を有する支持体、  
支持体の第1の表面上に配置された複数の自己アドレス可能な電極であって該支持体の第1の表面に隣接した接触部分を有する電極、および  
電極への個々の電氣的接続を含む電子的装置。
2. 電極への個々の電氣的接続が支持体の第1の表面上に配置されたリードを含む請求項1の電子的装置。
3. 電極への個々の電氣的接続が、電極の接触部分から支持体中へと伸長している電氣的経路である請求項1の電子的装置。
4. 支持体が絶縁体を包含する請求項1の電子的装置。
5. 絶縁体が酸化物である請求項4の電子的装置。
6. 支持体が半導体材料を包含する請求項1の電子的装置。
7. 半導体を包含する支持体が、さらにその上に配置された酸化物層を包含する請求項6の電子的装置。
8. 制御エレクトロニクスが半導体材料中に包含されており、電極への個々の電氣的接続を介して接続されている請求項6の電子的装置。
9. さらに電極への光学的アクセスを包含する請求項1の電子的装置。
10. 電極の接触部分にアクセスするように光学的アクセスが支持体を通して形成されている請求項9の電子的装置。
11. 光学的アクセスが光ファイバーを包含する請求項9または10の電子的装置。
12. 光学的アクセスが光パイプを包含する請求項9または10の電子的装置。
13. アクセスが開口部を含む請求項9の電子的装置。
14. さらに電極上に配置された浸透層を包含する請求項1の電子的装置。
15. さらに電極上部に配置された付着層を包含する請求項1の電子的装置。

16. さらに浸透層上部に配置された付着層を包含する請求項14の電子的装置。

17. さらに支持体上部に配置された封入容器を包含する請求項1の電子的装置。

18. 複数の電極を有する能動的でプログラム可能な電子的微小生物学的システムとともに用いる制御システムであって、

ユーザーインプットを受け、電極における独立した電子的環境を発生させるための制御シグナルを包含するアウトプットを提供するように適用されるコントローラー、

コントローラーのインプットに接続された、ユーザー指示を受けるためのインプットシステム、

電極における所望の電子的環境を提供するためのジェネレーターであってコントローラーアウトプットの制御下で作動するジェネレーター、および

能動的でプログラム可能な電子的システムに制御システムを接続するために適用されるインターフェースを含む制御システム。

19. ジェネレーターが電源を含む請求項18の制御システム。

20. 電源が、規定された電源である請求項19の制御システム。

21. ジェネレーターが波形発生器を含む請求項18の制御システム。

22. インターフェースがリレーシステムを包含する請求項18の制御システム。

23. インターフェースシステムが、ジェネレーターから電極への選択的接続を提供するためのリレーを包含する請求項22の制御システム。

24. インターフェースが、ジェネレーターのアウトプットの極性を変化させるように適用されるリレーを包含する請求項22の制御システム。

25. インターフェースが、シグナルの第1のレベルまたは第2のレベルいずれかとの選択的接続を提供するためのリレーを包含する請求項22の制御システム。

26. シグナルが前以て決定された電圧レベルである請求項25の制御システム。

27. シグナルが前以て決定されたレベルの電流を含む請求項25の制御システム。

28. コントローラーがコンピューターを含む請求項18の制御システム。

29. コントローラーがマイクロプロセッサに基づくものである請求項18の制御システム。

30. さらにユーザーに情報を提供するためのアウトプットシステムを包含している請求項18の制御システム。

31. アウトプットシステムがディスプレイを包含する請求項30の制御システム。

32. DNA含有溶液における複雑さを減少させる方法であって、下記工程：  
DNAを支持体に結合させ、所望物質を含むDNAの少なくとも一部を未結合のままとし、

結合物質を未結合物質から切り取り、次いで、

切り取られた物質を残存している結合物質から除去する  
を含む方法。

33. DNAを相補的DNAにハイブリダイゼーションさせることにより結合が行われる、請求項32のDNA含有溶液における複雑さを減少させる方法。

34. 制限酵素の使用により切り取りが行われる請求項32の複雑さを減少させる方法。

35. 切り取られた物質が電気泳動力により除去される請求項32のDNA含有溶液における複雑さを減少させる方法。

36. 分子生物学的反応を行うためのシステムであって、

分析される物質を含有する試料を受けるためのインプット、

試料調製ユニット、および

複数の個々にアクセス可能な電極を包含する能動的でプログラム可能な電子的

を含むシステム。

37. 能動的でプログラム可能なマトリックスが電極の配列を含む請求項36のシステム。

38. さらに能動的でプログラム可能な電極が電極上方に配置された付着層を包含する請求項36のシステム。

39. 付着層が捕捉配列を包含する請求項38のシステム。

40. さらに能動的でプログラム可能な装置をモニターするために作動するように配置された検出器を包含する請求項36のシステム。

41. 検出器がイメージングシステムを含む請求項40のシステム。

42. イメージングシステムがCCDカメラを含む請求項41のシステム。

43. さらに検出システムのアウトプットを受けるために適用される分析システムを含む請求項40のシステム。

44. 試料調製ユニットがセルソーターを包含する請求項36のシステム。

45. 試料調製ユニットがDNAセクターを包含する請求項36のシステム。

46. 試料調製ユニットが制限フラグメントセクターを包含する請求項36のシステム。

47. 試料調製ユニットが増幅システムを包含する請求項36のシステム。

48. 増幅ユニットがポリメラーゼ連鎖反応を用いるものである請求項47のシステム。

49. さらに試薬送達システムを包含する請求項36のシステム。

50. 試薬送達システムが電子的試薬送達システムである請求項49のシステム。

51. 試薬送達システムが流動性試薬送達システムである請求項49のシステム。

52. さらに廃棄物処理システムを包含する請求項36のシステム。

53. 廃棄物処理システムが電子的廃棄物処理システムである請求項52のシステム。

54. 廃棄物処理システムが流動性廃棄物処理システムである請求項52のシステム。

## 【発明の詳細な説明】

## 自動化された分子生物学的診断システム

## 発明の分野

本発明は、多フォーマットでの多工程分子生物学的タイプの診断分析を行うための装置およびシステムに関する。より詳細には、分子生物学的タイプの分析は種々の核酸ハイブリダイゼーション反応および関連バイオポリマー合成を包含する。さらに、抗体/抗原反応および他の臨床診断を行うこともできる。

## 関連出願の情報

本願は、1993年11月1日出願の第07/146,504号の一部継続出願である1994年7月7日出願の第08/271,882号の一部継続出願である。両出願は「分子生物学的分析および診断のための自己アドレス可能かつ自己アッセンブリング微小電氣的システムおよび装置 (SELF-ADDRESSABLE SELF-ASSEMBLING MICROELECTRIC SYSTEMS AND DEVICES FOR MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS)」と題されている。

## 発明の背景

分子生物学は核酸および蛋白の分析のための広範な方法を含んでいる。これらの方法および手順の多くは臨床診断アッセイおよび臨床試験の基礎を形成している。これらの方法は核酸ハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、遺伝学的配列の分析および核酸および蛋白の分離および精製を包含する（例えば、J.sambrook, E.F.Fritsch, and T.Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988 参照）。

これらの方法の大部分は多数の試料について多くの操作（例えば、ピペッティング、遠心分離、電気泳動）を行うことを必要とする。それらはしばしば複雑で

あり、時間がかかり、一般的には高度の正確さを要する。感度、特異性または再現性の欠如により、多くの方法はその適用が限られている。例えば、これらの問題は、核酸ハイブリダイゼーション分析の多くの診断への適用を制限している。

遺伝学的疾病または感染性疾病のDNAハイブリダイゼーション分析を行うた

めの完全なプロセスは非常に複雑である。おおまかに言えば、完全なプロセスを多くの工程および下位工程に分けることができる(図1参照)。遺伝学的疾病の診断の場合、第1工程は試料(血液または組織)の取得を包含する。試料のタイプに応じて、種々の前処理を行う。第2工程は細胞の破壊または溶解を包含し、ついで、他の細胞構成成分を伴った粗DNA材料の遊離を行う。一般的には、いくつかの下位工程は細胞残渣を除去し、粗DNAをさらに精製するために必要である。この点において、さらなる処理および分析のためのいくつかのオプションがある。1のオプションは、精製DNAを変性させることおよび多くのフォーマット(ドットプロット、マイクロビーズ、マイクロタイタープレート等)のうちの1つにおいて直接ハイブリダイゼーション分析を行うことを包含する。サザンプロットハイブリダイゼーションと呼ばれる第2のオプションは、制限酵素を用いてDNAを開裂すること、電気泳動ゲル上でDNAフラグメントを分離すること、膜フィルターへのブロッティング、ついで、プロットを特定のDNAプローブ配列にハイブリダイゼーションさせることを包含する。この方法はゲノムDNA試料の複雑さを効果的に減少させ、それによりハイブリダイゼーション特異性および感度の改善を助ける。不幸にも、この方法は時間がかかり、困難である。第3のオプションは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または他の増幅方法を行うことである。PCR法は標的DNA配列の数を増幅(増加)する。標的DNAの増幅は、ゲノムDNA分析における複雑さおよび感度に関連する問題を克服することを助ける。これらすべての方法は時間がかかり、比較的複雑であり、診断試験のコストを有意に増加させる。これらの試料調製およびDNA加工工程後、実施のハイブリダイゼーション反応を行う。最後に、検出およびデータ分析によりハイブリダイゼーションが分析結果に変換される。

典型的には、試料調製および加工の工程は、ハイブリダイゼーションおよび検出および分析という他の主要工程とは分離して行われている。実際には、試料調製およびDNA加工を含む種々の下位工程は、しばしば、他の下位工程とは別個の操作として行われている。これらの下位工程をより詳細に考慮して、全血、組織または他の生物学的流動体試料の取得のごとき多くの手段により試料が得られ



ている。血液の場合、試料を加工して赤血球を除去し、所望の有核細胞（白血球）を維持する。通常には、このプロセスは密度勾配遠心分離により行う。次いで、好ましくは超音波処理、凍結／融解により、または溶解試薬の添加により、細胞の破壊または溶解を行う。次いで、遠心分離工程により粗DNAを細胞残渣から分離する。ハイブリダイゼーションの前に、2本鎖DNAを変性させて1本鎖形態にする。一般的には、2本鎖DNAの変性は加熱（ $> T_m$ ）、塩濃度変化、塩基（NaOH）の添加、または変性剤（尿素、ホルムアミド等）により行われている。研究者は、電気化学的セル中での1本鎖形態へのDNAの変性を示唆している。その理論は、電極界面でのDNAへの電子輸送が存在するためと言われており、それにより2本鎖構造が効果的に弱体化され、鎖の分離が起こる。一般的には、1992年3月18日公開のStanley, "DNA Denaturation by an Electric Potential" 英国特許出願第2,247,889号参照。

一般的には、核酸ハイブリダイゼーション分析は、比較的多数の複合非標的核酸の中から過剰のプローブDNAを用いて非常に少数の特異的標的核酸（DNAまたはRNA）を検出することを包含する。低コピー数（すなわち、10000ないし100000）の核酸標的の検出を助けるために試料調製物中のDNAの複雑さを減らす下位工程が用いられている。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いる標的核酸の増幅により複雑さがある程度克服される（M.A. Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990）。増幅は莫大な数の標的核酸配列を生じ、その後の直接プローブハイブリダイゼーション工程を改善するが、増幅は時間が長くなり煩わしい手順を必要とする。実際には、増幅工程を行うために複雑で比較的大型の装置が必要である。

現実のハイブリダイゼーション反応は、全工程中最も重要で、中心的な工程である。ハイブリダイゼーション工程は、標的DNA配列へのハイブリダイゼーション

ンが起こるような一組の最適条件において、調製されたDNA試料を特異的なレポータープローブと接触させることを包含する。多くのフォーマットのうちのいずれか1つにおいてハイブリダイゼーションを行うことができる。例えば、複数

の試料核酸ハイブリダイゼーション分析が種々のフィルターおよび固体支持体フォーマットにより行われている (G.A.Beltz et al., Methods in Enzymology, Vol. 100, Part B, R.Wu, L.Grossman, K.Moldave, Eds., Academic Press, New York, Chapter 19, pp.266-308, 1985参照)。いわゆる「ドット・プロット」と呼ばれる1のフォーマットは、標的DNAのフィルターへの非共有結合的付着を包含し、次いで、標的DNAは放射性標識プローブとハイブリダイゼーションされる。「ドット・プロット」ハイブリダイゼーションは広く使用され、多くのバージョンが開発された (M.L.M.Anderson and B.D.Young, Nucleic Acid Hybridization-A Practical Approach, B.D.Hames and S.J.Higgins, Eds., IRL Press, Washington, D.C. Chapter 4, pp.73-111, 1985参照)。ドット・プロットは、ゲノム変異についての複数の分析 (D.Nanibhushan and D.Rabin, EPA 0228075 (1987年7月8日)) のためおよび重複クローンの検出とゲノム地図の構築 (G.A.Evans, 米国特許第5, 219, 726号 (1993年6月15日)) のために開発された。

微小フォーマットの複数装置またはマトリックス装置上での複数の試料核酸ハイブリダイゼーション分析を行うために新たな方法が開発されている (例えば、DNAチップ) (M.Barinaga, 253 Science, pp.1489, 1991; W.Bains, 10 Bio/Technology, pp.757-758, 1992参照)。通常には、これらの方法は、DNAチップの微小ウェルのごとき固体支持体の非常に小さな特定エリアに特定のDNA配列を付着させる。これらのハイブリダイゼーションフォーマットは慣用的な「ドット・プロット」および「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションシステムの微小スケールバージョンである。

微小フォーマットのハイブリダイゼーションを用いて「ハイブリダイゼーションによる配列決定」(SBH)を行うことができる (M.Barinaga, 253 Science, pp.1489, 1991; W.Bains, 10 Bio/Technology, pp.757-758, 1992参照)。SBHは、すべての可能なn-ヌクレオチドオリゴマー (n-mer) を利用して未知

DNA試料中のn-merを同定し、次いで、アルゴリズム分析によりDNA配列を得るものである (R.Drmanac and R.Crkvenjakov, ユーゴスラビア特許出願第570/87号 (1989年); Strezoska et al., 88 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 10089, 199

2; および R. Drmanac and R. B. Crkvenjakov, 米国特許第 5,202,231 号 (1993 年 4 月 13 日) ) 。

S B H を行うために 2 つのフォーマットがある。第 1 のフォーマットは、支持体上にすべての可能な *n-mer* の配置を作り、次いで、それを標的核酸にハイブリダイゼーションさせることを包含する。第 2 のフォーマットは、標的配列を支持体に付着させ、すべての可能な *n-mer* で連続的にプローブすることを包含する。両フォーマットは、直接プローブハイブリダイゼーションおよび複数のハイブリダイゼーションに関連したさらなる困難性の問題を有する。

Southern, 英国特許出願 GB8810400, 1988 年; E. M. Southern et al., *Genomics* 1008, 1992 は、DNA 分析または配列決定のための第 1 のフォーマットの使用を提案した。Southern は、PCR 増幅されたゲノム DNA を用いて既知単一点突然変異を同定した。また Southern は、S B H のための固体支持体上でのオリゴヌクレオチド配置の合成方法を記載した。しかしながら、Southern は、いかにして配置上の各オリゴヌクレオチドについて最適な厳密さの条件を達成するのかについては述べなかった。

同時に、Drmanac et al., 260 *Science* 1649-1652, 1993 は、いくつかの短い (116 bp) DNA 配列を配列決定するために第 2 のフォーマットを用いた。標的 DNA を膜支持体に付着させた (「ドット・プロット」フォーマット)。各フィルターを 272 個の標識 10-mer および 11-mer オリゴヌクレオチドと連続的にハイブリダイゼーションさせた。広範な厳密性の条件を用いて各 *n-mer* プローブに対する特異的ハイブリダイゼーションを達成した。洗浄時間は 5 分から一晩、温度は 0℃ から 16℃ とした。フィルターを 2 ないし 18 時間露出してハイブリダイゼーションシグナルを検出しなければならなかった。単純な標的配列、オリゴマープローブのセットの減少、および利用可能な最も厳密な条件の使用にもかかわらず、正味の偽陽性ハイブリダイゼーション率は 5% であった。

ハイブリダイゼーションの検出および分析のための種々の方法が存在する。DNA プローブを標識するレポーター基 (蛍光発色団、酵素、ラジオアイソトープ

等)に応じて、フルオロメトリー、比色法またはオートラジオグラフィーにより検出および分析を行う。蛍光放射または粒子放射のごとき放射を観察および測定することにより、ハイブリダイゼーションについての情報を得ることができる。検出方法が非常に高い固有感度を有する場合でさえ、非特異的結合物質のバックグラウンド存在によりハイブリダイゼーションの検出は困難である。多くの他の因子もDNAハイブリダイゼーションアッセイの感度および選択性を減じる。

特定の加工工程または下位工程を一緒にするための試行が行われている。例えば、支持体材料上にDNAプローブを配置するために種々の微小ロボットシステムが提案されている。例えば、Beattie et al., The 1992 San Diego Conference : Genetic Recognition, 1992年11月は、微小ロボットシステムを用いて特定のDNA配列を含む微小液滴をガラス基材上の個々の微小成形された試料ウェル中に置いた。

一般的には、先行技術の方法は非常に労力が必要で時間がかかるものであった。例えば、PCR増幅法は時間がかかり、診断アッセイにコストを付加する。人の介入を必要とする複数工程は、プロセス中またはプロセス間のいずれにおいても、コンタミネーションおよび操作者のエラーの可能性があるという点で最適なものではない。さらに、個々のプロセスを行うための複数の機械または複雑なロボットシステムの使用は、費用および物理的スペースの両方の必要性のために、しばしば、最大の研究室を除いては用いることが困難である。

上記から明らかなように、多工程の多数の分子生物学的反応を行うための効果的な方法を得るために多くの試行が行われてきた。しかしながら、上記理由により、これらの方法は「断片的」なものであり、限られたものである。完全なDNA診断アッセイを行うことのできるシステムを形成するためにこれらの種々のアプローチを組み合わせるのは容易ではない。かかるシステムについて長い間必要性が認識されていたにもかかわらず、満足な解決策は未だ提示されていない。

#### 発明の概要

本発明は、顕微鏡フォーマットにおいて制御された多工程加工および多反応を能動的に行うことのできる自己アドレス可能、自己集合的微小電子的装置および

システムの設計、成形および使用に関する。これらの反応は、核酸ハイブリダイゼーション、抗体／抗原反応および関連臨床診断のごとき大部分の分子生物学的方法を包含するが、これらに限らない。さらに、クレイムされた装置およびシステムは、特定の装置上での特定の微小位置における異なるオリゴヌクレオチドまたはペプチドの合成（これらに限らない）を包含する多工程を組み合わせたバイオポリマー合成を行うことができる。

微小リソグラフィ法および微小機械加工法の両方を用いてクレイムされた装置およびシステムを成形する。基本的な装置は、アドレス可能な顕微鏡的位置のマトリックスをその表面上に有する。それぞれ個別の微小位置は電子的に制御可能で、それ自体への特定の結合物質（例えば、核酸、酵素、抗体）の輸送および付着を指令しうる。すべての微小位置はそれらの特異的結合物質を用いてアドレス可能である。自己アドレスプロセスは、フルイディクスまたは機械的コンポーネントに関して最小限の外部からの介入を必要とする。

装置は、種々のアッセイおよび反応を制御し、能動的にこれらを行うことができる。分析物または反応物を自由電界電気泳動により特定の微小位置に輸送することができ、そこで分析物または反応物が効果的に濃縮され、微小位置において特異的結合物質と反応させられる。ハイブリダイゼーションアッセイの場合、ハイブリダイゼーション反応物が特定の顕微鏡的位置において濃縮されるので、特定の分析物または反応物の検出感度が改善される。微小位置の極性を逆転させることにより未結合分析物または反応物が除去される。かくして、装置は反応特異性をも改善する。核酸ハイブリダイゼーションおよび他の分析のための基本的な装置はAPEX装置とも呼ばれ、それはアドレス可能プログラム可能電子的マトリックスを意味する。

本発明の1の態様において、さらなる加工工程または下位工程を「システム」

と連動して行うことができる。システムはコンポーネント装置の統合された配列である。各コンポーネント装置は、個々の機能を発揮するように適当に設計され適当なサイズを有する。その最も完全な具体例において、システムはすべての態様の試料調製、ハイブリダイゼーションおよび検出および分析を行うことができ

る。この最大の形態において、例えば、電子的セルソーターコンポーネントにより、まず試料が調製される。一般的には、電子的とは、より詳細には電気泳動により荷電物質を輸送するコンポーネントの能力をいう。所望により、粗DNAセクターコンポーネントおよび制限フラグメントセクターコンポーネントによってさらなるDNA加工および複雑さの減少を行ってもよい。最終加工された標的DNAは分析コンポーネントに輸送され、顕微鏡的多フォーマットで電子的ハイブリダイゼーション分析が行われる。この分析コンポーネント装置をAPEXまたは分析チップともいう。関連分析およびイメージ分析コンポーネントが結果を提供する。

システム内で、所望により、自由電界電気泳動、チャネリング、フルイデックスまたは他の方法によって材料をコンポーネント（装置）間において輸送してもよい。所望により、電子的試薬ディスペンサーコンポーネントによりシステムの種々の加工コンポーネントへの試薬の電子的輸送を行ってもよい。所望により、電極および荷電廃棄産物を吸引し保持する荷電マトリックス材料を提供することによって電子的廃棄物処理システムを形成してもよい。所望により、電子的DNAフラグメント貯蔵システムを、後のハイブリダイゼーション分析のために他のDNAフラグメントを一時的に保持するために役立てることもできる。

本発明の1の態様において、所望標的配列を欠くバルクDNA材料から所望標的配列を含む特定のDNAフラグメントを単離するプロセスにより、ゲノムDNAの複雑さの減少を行う。粗DNAを輸送し、支持体材料上に捕捉することができる。次いで、適当な制限酵素を用いて結合DNAを切り取ることができる。切り離した後、特定のDNAフラグメントに選択的にハイブリダイゼーションさせるコンポーネント装置にDNAフラグメントを輸送することができる。さらなる制限酵素開裂により分析すべき実際の標的配列を含むフラグメントを選択的に遊

離させることができ、システムの分析コンポーネント（APEXチップ）に輸送することができる。所望により、他の標的配列を含む他のフラグメントについてこの手順を繰り返してもよい。

装置（またはシステム）のコントローラーにより、装置の種々の態様の個々の

制御が行われる。アドレス可能な顕微鏡的位置を含むAPEX装置またはチップを用いる場合、コントローラーは個々の微小位置を電子的に制御することができ、当該位置への特異的結合物質の輸送または付着の指令をする。完全かつ正確な電子的制御により、好ましくはマイクロプロセッサに基づくコンポーネントにより装置は多工程および多反応を実行することができる。装置上の特定の微小位置において多工程および多反応の速度、特異性および感度が大いに改善される。ディスプレイおよびキーボードインプットのごときインプット／アウトプット装置を介してコントローラーはユーザーに対面する。インプット／アウトプット装置はコントローラーに接続され、コントローラーは、システム上のアドレス可能な電子的位置の電気的狀態を制御する。詳細には、コントローラーは電源／波形発生器を指令して種々の微小位置の電子的狀態を作り出す。所望により、電源／波形発生器とAPEX装置もしくはシステムとの間においてインターフェースを使用する。好ましくは、インターフェースは、多機能インプット／アウトプットコネクションを介してコントローラーに従属しているリレーのバンクを含む。好ましくは、リレーは、極性、接続の有無および個々の位置に供給される電圧または電流の量に応じて接続を制御することにより、電源／波形発生器をAPEX装置に接続するのに役立つ。好ましくは、コントローラーはハイブリダイゼーションシステムに向けられた照明源を制御する。検出器、イメージプロセッシングおよびデータ分析システムはAPEX装置に光学的に連結される。好ましい具体例において、蛍光顕微鏡は、装置の種々の微小位置で起こるハイブリダイゼーションからの映像を受け取って拡大する。発光を光学的にフィルターに通し、電荷結合素子(CCD)の配列またはマイクロチャンネルプレート検出器により検出する。好ましくは、モニター上に結果をユーザーに示す。

本発明のもう1つの態様において、制御エレクトロニクスを有する基材の頂上

に形成された複数の微小位置を有するハイブリダイゼーションシステムが形成される。詳細には、スイッチング回路を設けてここに微小位置にアドレスする。試料コンタクトが行われる位置の後面から電氣的接続を行う。さらに、導波管のごとき光学的経路を微小位置の下方に配置して微小位置への後面アクセスを可能に

する。必要ならば、導波管を介して微小位置に対して光学的励起を行ってもよい。後面の導波管を介して発光放射の検出を行ってもよい。本発明のさらにもう1つの態様において、試料封入システムがシステム上に、詳細にはハイブリダイゼーションマトリックス領域に配置される。好ましい具体例において、マトリックスハイブリダイゼーション領域（試料封入コンポーネントを含む）は、電子的制御および検出器エレメントを提供する装置の残りの部分からの分離に適するように改作される。

本発明のもう1つの態様において、マトリックスハイブリダイゼーションシステム形成のための改良されたプロセスが記載される。1のプロセスにおいて、シリコンのごとき基材が厚い酸化物のごとき絶縁層を伴って形成される。例えば、金属（例えばアルミニウムまたは金）の蒸着により導電性微小位置が形成され、次いで、例えば、慣用的な光リソグラフィ法によりパターンが形成される。PECVDにより形成されたTEOSのごとき絶縁コーティングが形成される。所望により、窒化物不動態化コーティングがTEOS層上に形成される。窒化物およびガラスを通して微小電極に対する開口部が形成される。所望により、チタタングステンのごとき付着改善材料を金属材料とのコネクションに用いて酸化物および／またはガラスへの付着を促進してもよい。さらなる改良において、基材により支持されている酸化物層上に配置された窒化物層をアンダーカットすることにより、電極の頂上にウェルを形成してもよい。

個々の微小位置の電子的制御により電圧または電流を制御することができる。1の相をセットしたら、もう1つの相をモニターすることができる。例えば、電圧をセットしたら、電流をモニターすることができる。電圧および／または電流を直流モードで提供してもよく、あるいは時間とともに変化させてもよい。例えば、有利には、パルス電流またはDCバイアスを用いることができる。

したがって、生物学的材料の試料調製、加工、ハイブリダイゼーション、検出および分析のためのシステムを提供することが本発明の1の目的である。

統合されたシステム内において多工程または下位工程を一緒にするシステムを提供することが本発明のさらなる目的である。



自動DNA診断システムを提供することが本発明のさらなる目的である。

#### 図面の簡単な説明

図1は試料調製、ハイブリダイゼーションおよび検出およびデータ分析のための工程および下位工程の配列を示す。

図2Aおよび2Bは能動的でプログラム可能なマトリックスシステムを断面図(図2A)および透視図(図2B)で示す。

図3は金属マスク層における能動的でプログラム可能なマトリックスシステム構造を示す。

図4は能動的でプログラム可能なマトリックスシステムを平面図で示す。

図5は単一微小位置および電気的接続の透視図を示す。

図6は電子的セルソーターマトリックス、DNAセクターおよび制限フラグメントセクターおよびハイブリダイゼーションマトリックスを包含するシステムの平面図を示す。

図7は制御システムのブロックダイアグラムを示す。

図8は関連エレクトロニクスを有する能動的でプログラム可能なマトリックスシステムの断面図である。

図9は微小位置および生物学的封入カバーの後面へのエレクトロニクスおよび光学的アクセスを有する、別の層状の能動的でプログラム可能なマトリックスシステムの断面図である。

図10はメイティングキャリアにマウントされたAPEXシステムの透視図を示す。

図11A-Gは装置組み立てにおける加工工程を示す。

図12はポリシリコン構造物を用いて組み立てられた装置の断面図を示す。

図13は付着促進層を用いて組み立てられた装置の断面図を示す。

図14は拡大されたりザーバー空間を電極上に有する装置を示す。

図15は種々の電圧および電流規定を示す。

図16はDNA精製システムの断面図を示す。

図17は毛細管配列製造システムおよび装置の断面図を示す。

図18は同心円構造の微小位置の透視図を示す。

#### 発明の詳細な説明

図2Aおよび2Bは、本発明に用いる能動的でプログラム可能な電子的マトリックスハイブリダイゼーションシステムの単純化バージョンを説明する。一般的には、基材10は電子的にアドレス可能な微小位置12を支持する。説明を簡単にするために、図2A中の種々の微小位置に12A、12B、12Cおよび12Dと標識を付ける。浸透層14は個々の電極12上方に配置される。浸透層は比較的小型の荷電物質の浸透を可能にするが、DNAのごとき大型の荷電物質を排除して電極12とは直接接触させない。浸透層14は、電極12と直接接触することによりDNAに生じる電気化学的分解を回避する。さらに浸透層は、DNAの電極への強力な非特異的吸着を回避するのに役立つ。付着領域16は浸透層14上に配置され、標的物質に対する特異的結合部位を提供する。それぞれ電極12A-Dに対応して、付着領域16に16A、16B、16Cおよび16Dと標識する。

作動の際に、リザーバー18は、付着領域16上方の空間を含み、検出、分析または使用のための所望ならびに所望でない物質を含む。荷電DNAのごとき荷電物質20がリザーバー18中に存在する。本発明の1の態様において、能動的でプログラム可能なマトリックスシステムは、荷電物質20を個々の微小位置12のいずれかに輸送するための方法を含む。活性化された場合、微小位置12は、荷電し機能化された特異的結合物質20の電極12方向への自由電界電気泳動的輸送を引き起こす。例えば、電極12Aを正にして電極12Dを負にした場合、電気泳動カライン22は電極12Aと12Dとの間を走るであろう。電気泳

動力のライン22は正味の負電荷を有する荷電結合物質20の正電極12A方向への輸送を引き起こす。正味の正電荷を有する荷電物質20は、電気泳動力の下で負に荷電した電極12D方向へと移動する。電気泳動力の下でのその移動の結果として、機能化された正味負に荷電した結合物質20が付着層16Aに接触した場合、機能化され特異的結合物質20は付着層16Aに共有結合するようになる。

対応する電極12Bおよび12Cを負にすることにより、16Bおよび16Cのごとき反応に供されない付着層を保護することが可能である。このことにより、付着領域16Bから発出した電気泳動力のラインを生じる（簡単のために16Bについてのみ述べる、16Cについても同様の結果である）。電気泳動力ライン24は、負に荷電した結合物質20を付着層16Bから取り去って付着層16A方向に向けることに役立つ。このようにして、付着層16周囲に「力の場」保護が形成され、その時点では荷電分子20との反応性を有しないことが望ましい。

このシステムの1の非常に有利な結果は、荷電結合物質20がシグナル付着層16に隣接した領域において非常に濃縮されうることである。透視図2Bにおいてわかるように、個々の微小位置26Aが正に荷電し、残りの微小位置が負に荷電した場合、電気泳動力のラインは、正味負に荷電した結合物質20の微小位置26A方向への輸送を引き起こすであろう。微小位置26Aは、図2Aにおける付着層16、浸透層14および下にある電極12との組み合わせを示す。このようにして、装置上の特定の微小位置において分析物または反応物を濃縮し反応させる方法を行うことができる。特異的結合物質20の付着層16への付着後、下にある微小電極12を直流モードで機能させてもよい。このユニークな特徴により、溶液中で遊離状態の比較的希薄な荷電分析物または反応物分子を、分析物または反応物分子と逆の電荷に維持された特定の微小位置に迅速に輸送し、濃縮し、次いで、連続的または並行的方法で反応させることができる。選択された微小位置26において希薄分析物または反応物分子を濃縮するこの能力は、これらの微小位置26における反応速度を大いに加速する。

所望の反応が完了した後、電極12の電位を逆転させ、そのことにより以前の

吸引力とは逆の方向の電気泳動力が生じる。このようにして非特異的分析物または未反応分子を微小位置26から除去することができる。特定の分析物または反応生成物を微小位置26から遊離させ、さらなる分析のために他の位置に輸送することができ、あるいは他のアドレス可能な位置に貯蔵することができ、あるいはシステムから完全に除去することができる。電場の逆転によるこの物質の除去

または脱濃縮は、非特異的結合物質の除去を引き起こすことによってシステムの識別能を向上させる。付着層16上の非特異的結合物質に対して現時点では反発的である電気泳動力の量を制御することにより、電子的な厳密性の制御を行うことができる。電極12における電位を上昇させて部分的にハイブリダイゼーションしたDNA配列を除去するに十分な電場を作ることにより、単一ミスマッチハイブリダイゼーションの同定が可能となり、点突然変異を同定することができる

種々の付着層16において操作を並行または連続して行うことができる。例えば、図2Aを参照すると、まず、図示したような電位を用いて付着層16において反応を行うことができる。電極12Aにおける電位を逆転させ、すなわち負電位にして隣接電極12Bを正にすることができる。このようにして、一連の反応を行う。付着層16Aに特異的に結合しない物質は、付着層16Bへの電気泳動力により輸送される。このようにして、濃縮を用いて特定の付着層において高濃度とし、次いで、正の電気泳動力に供する。次に、濃縮された物質を隣接または他の付着層16に移すことができる。別法として、電極12から発出して付着層を通過しリザーバー18中に向かう正味の電気泳動力の場が存在するという意味において複数の付着層16を脱保護してもよい。複数の付着層16を脱保護することにより複数の反応を行う。特定の付着層16によりアドレスされた特定の環境は他の付着層16周辺的环境とは異なるという点で、それぞれの部位26は本質的に個別の生物学的「試験管」として役立ちうる。

図3は、能動的でプログラム可能な電子的マトリックスシステムのための金属マスク層の平面図を示す。好ましくは、複数の個別電極30は列をなしている。例えば、8x8マトリックスとなった個別電極30を形成する。所望により、さらなる制御パッドまたはダンプパッド(damp pad)32を設けて所望の電気泳動場の発生を助けてもよい。電極30およびパッド32はパッド34に接触するよう接続されている。68個の接触パッドを64個の電極30および4個のパッド32に対応して示す。リード36は電極30およびパッド32をそれぞれコンタクト34に接続している。図示したように、羽を広げたようなパターンを用いて

電極30およびパッド32の比較的密集した領域からマスクの境界36への接続を可能にする。

図4は、図3のマスクの拡大詳細平面図を示す。得られる金属化システムは実質的にマスクされたパターンと同様であるように見える。実質的に四角形構造として形成された電極30を示す。リードライン36は電極30を接触パッド34に接続する(図3)。好ましいリード36のライン幅は1ないし20ミクロンである。

図5は1個の電極50の透視図を示す。電極50はリード52に直接接続されている。浸透層54はリード50の上部に配置されている。付着層56は浸透層上に配置されている。

微小リソグラフィ的に製造された装置中の浸透層は厚さ1nmないし500マイクロメートルの範囲であってよく、500nmないし50マイクロメートルが最も好ましい。浸透層は電極表面全体を覆うべきである。ポリマー、セラミックス、ゾルーゲル、層状コンポジット材料、粘土および多孔率を調節した多孔性ガラスのごとき適当な材料から浸透層を製造することができる。

図6は、自動試料調製および調製材料のハイブリダイゼーションのための完全なシステム60を示す。血液または他の生物学的物質のごとき試料62をシステム60に導入する。一般的には、試料添加ポート64を用意する。一般的には、生物学的封入構造が下に存在していて、ポート64を介するアクセスなしにはシステム中に試料62を直接置くことができない場合に、試料添加ポート64を用いる。

電子的セルソーターマトリックスコンポーネント66およびDNAセクターコンポーネント68および制限フラグメントセクターコンポーネント70の組み合わせにより、このシステム60において試料調製を行う。電子的セルソーター

マトリックスコンポーネント66は、浸透層および付着層を伴った下に存在している電極からなる。これらは細胞の付着のための位置のマトリックスを効果的に形成する。一般的には、個々の位置のためのエリアおよび完全なマトリックスのエリアは分析装置コンポーネントにおけるエリアよりも大きい。よって、電子

的セルソーターマトリックスは、異なる試料による細胞数の変動および試料サイズの変動に適宜適応する規模である。一般的には、付着層は細胞に関して選択的であってよく、あるいは異なるタイプの細胞に関して個別選択的であってもよい。所望により、ある種のタイプの細胞に関して選択的な群またはセットになった位置を作ってもよい。特異的抗体または細胞付着因子を付着層に付着させることにより細胞選択性を付与することができる。マトリックス66は自由電界電気泳動により作動する。

粗DNAセクター68および制限フラグメントセクター70は、電子的セルソーターマトリックス66からの粗DNAアウトプットを結合させ、結合物質から所望DNAを選択的に開裂させることに役立つ。DNA単離または複雑さの減少において最終段階でないことを示すためだけに用語「粗」を用いる。所望DNA物質を含まないと考えられる領域においてDNAがセクターに結合する。次いで、例えば制限酵素の適用により所望DNA物質が結合物質から切り取られる。次いで、切り取られた未結合物質を粗DNAセクター68から制限フラグメントセクター70へと物理的に移動させる。好ましくは、電気泳動的輸送を用いて切り取られた物質を除去する。切り取られた物質をセクターに結合させ、それに制限酵素を作用させて所望DNAを含む未結合部分を開裂させることにより、このプロセスを繰り返すことができる。

例えば、ヒト・DNAは約100000個の遺伝子を含んでいる。全DNA材料のうち、かなりの部分は所望DNA情報を含まない繰り返し配列を構成している。これらの非情報所有繰り返し配列によりDNAをセクターに結合させることができる。分析すべき所望DNAを含むと考えられる未結合DNAから結合DNAを切り取ることができる。次いで、さらに特異的な配列を用いてこのプロセスを繰り返し、セクターへの物質の結合を生じさせてもよい。

次いで、制限フラグメントセクター70からのアウトプットをAPEXチップ72に供給する。図2Aおよび2Bに関して説明されたようにマトリックス72上で操作を行う。

DNAの複雑さを減少させるための別法は、DNAに基づくアフィニティーク

ロマトグラフィーの使用である。1本鎖DNA断片が別の1本鎖DNA断片に対して有するアフィニティーは、どれほど塩基対がマッチしているかによる。クロマトグラフィー系の固定相が特定の配列または配列の集合を含む場合、移動相中の1本鎖DNAは、固定相中の捕捉配列とどの程度マッチしているかによって、多かれ少なかれ固定相に付着するであろう。このことにより、固定素中の捕捉配列に対するDNAのアフィニティーに基づくクロマトグラフィー分離が可能となる。

微小位置のマトリックスを用いてDNAに基づくアフィニティークロマトグラフィーを行うための1の方法は、特定の配列または配列のセットの捕捉プローブで一連の位置を修飾することである。これにより固定相が形成される。DNA試料を微小位置にアドレスさせ、1の微小位置から次の微小位置へと連続的に移動させる。電子的な厳密性の制御を用いて、各微小位置において捕捉プローブに十分にマッチするDNAを保持する。このようにして捕捉プローブに十分にマッチするDNAは試料から迅速に除去されるであろう。

一連の微小位置上でのDNAに基づくアフィニティークロマトグラフィーによるDNA試料の連続的精製についての本発明を一般化して連続バージョンとすることができる。図16はかかるシステムの断面図を示す。ここで、電極210は長い断片を形成し、適当な固定相により修飾されている。固定相上部のチャンネル212に移動相を入れる。対流物質移動により移動相を固定相上に通過させることができる。別法として、長い断片の電極の両端に分離独立電極216を設置することにより確立された電場214により、移動相中のイオンを固定素に沿って引っ張ることができる。断片電極に交番電流またはパルス電流を適用することによって電子的な厳密さを用いることができる。これによりDNAを固定相に付着および解離させる。

試料DNAの複雑さを減少させるためのさらなる別法は、微小多孔性媒体により試料をふるい分けすることによるサイズ選択である。任意の幾何学的配置の孔を樹枝状結晶で満たすことにより微小多孔性媒体を形成することができる。金属塩、セラミック形成材料、モノマーおよびポリマーのごとき化学試薬（これらに

限らない)の電気化学的沈着によりこれらの樹枝状結晶を形成する。電極に適用される電気シグナルを調節することによって微小多孔性媒体の多孔性度を調節することができる。例えば、樹枝状結晶は柵状構造または分枝状構造を形成することができる。

APEX装置上の微小多孔性媒体の形成方法は、対向する金属電極を伴った長いチャンネルの形成を包含する。このチャンネルを適当な化学試薬で満たし、適当な電気シグナルを電極に適用した場合、樹枝状結晶は電極間の隙間に生成し、微小多孔性媒体を形成する。

図6に戻ると、電子的試薬ディスペンサーシステム74を設置してシステム60に試薬を供給する。好ましくは、試薬が荷電している場合には電気泳動力により試薬を送達する。所望により、電子的廃棄物処理システム76をシステム60に含ませる。廃棄物処理システム76は荷電廃棄物粒子を引き付け、その上に荷電物質を保持することにより廃棄物粒子を処理する。システム60のもう1つの所望により存在してもよいメンバーはDNAフラグメント貯蔵システム78である。このフラグメント貯蔵システム78は後の分析のために一時的にDNAを保持するのに役立つ。

システム60は上記機能のいくつかまたはすべてを含んでいてもよい。例えば、DNAセレクター68および制限フラグメントセレクター70により行われるような複雑さを減少させる形態の試料調製のコンビネーションを分析マトリックス72と関連させてもよい。しかしながら、上記機能のいずれかまたはすべてを所望により一緒にしてもよい。

図7は、コントローラーを含むシステム全体のブロックダイアグラムを示す。制御された電位を電極に適用することにより、あるいは制御された電流を電極に通すことによりAPEX装置中に存在する電極を活性化させる。APEX装置の

各電極において電位または電流を独立して制御した場合に全機能が発揮される。APEXコントローラーシステムによりこれを行う。

コントローラーコンピューター80はユーザーのインプット/アウトプット装置、例えばディスプレイ82およびインプット装置84に対面している。ディス



プレイ82は、モニターまたはコンピュートースクリーンのような慣用的な形態であってよい。インプット84はキーボード、マウスまたはタッチスクリーン装置のような慣用的なユーザーインプット装置であってよい。コントローラーコンピューター80は電源および波形発生器86に接続されている。コントローラー80は電源および波形発生器86を規定して電流または電圧出力をインターフェース88に供給する。好ましい具体例において、電源または波形発生器86は正確に調節された電圧および電流源を供給できるものである。コントローラーコンピューター80は、多機能インプット/アウトプットボード90を介してインターフェース88に制御シグナルを供給する。インターフェース88によりAPEXシステム92用のコンタクトに簡単に接続できる。

好ましくは、インターフェースはリレーを含んでおり、電源および波形発生器86とAPEXシステム92の特定の電極との間の選択的接続を可能にする。1の具体例において、インターフェース88は複数のリレーを含み、それらは電源および波形発生器86をAPEXシステム92の電極に接続する。接続により、電源および波形発生器86とAPEXシステム92の電極との間の経路の選択または非選択が可能となる。さらに、別のリレーは、APEXシステム92の電極に供給される電圧の極性の選択を可能にする。所望により、例えば多アウトプット電源86から複数の電源レベルが利用できる場合、APEXシステム92の電極に接続される特定レベルを他の電極へのレベルから独立してセットすることができる。

よって、図2Aに関して説明したように、特定の電極（例えば12Bおよび12C）を負ではあるが電極12Dよりも電位を低くすることにより、局部的な力の場により付着領域16Bおよび16Cが保護される。

インターフェース88は、APEXシステム92中の個々の電極に対する所望の電圧を選択するのに役立つ。別法として、分圧器の使用によりかかる異なる電圧の配置を行ってもよい。

好ましい具体例において、コントローラーコンピューター80はMacintosh Quadra 950である。National Instruments CorporationのLabVIEWソフトウェアを

用いて、ユーザーがAPEXに接続された装置をプログラムしてアッセイからデータを収集し処理するためのソフトウェアインターフェースを提供する。National InstrumentsのNuBusボードを用いてQuadra 950コンピューターから電源装置86に至るハードウェアインターフェースを提供し、実際の電流および電位ならびにアッセイの結果を調べる。

LabVIEWソフトウェアを用いて作られたVirtual Instrumentによりユーザーがアッセイを制御する。virtual instrumentは、ユーザーが実行できる制御についてのユーザーフレンドリーなグラフィック表示を提供し、さらにアッセイを行うためにAPEX装置にこれらの制御を適用する場合の結果のいくつかをグラフィック表示する。ユーザーは、Quadra 950コンピューター80のキーボードおよびマウス（まとめてインプット84という）を通じてVirtual Instrumentとインターフェースする。Virtual Instrumentは、Quadra 950のNuBusデータバスに接続されたNational Instruments NB-MIO-16XL多目的インプット／アウトプット90およびNational Instruments DMA2800ボードへのソフトウェアインターフェースを提供する。

多目的I/Oボードは、デジタルおよび／またはアナログシグナルを外部装置に提供して、Virtual Instrumentを用いてユーザーにより特定されたプログラム済みシーケンスを実行することができる。また、MIOボードは、Virtual Instrumentの制御下で、APEXに接続された装置により生じたシグナルをデジタル化し貯蔵することができる。DMA2800は、Direct Memory Accessを介してMIOボードにより得られたデータを迅速に貯蔵しうる能力を提供し、Quadra 950のCPUをバイパスする。また、最も近代的な装備を有するDMA2800は、外部装置の制御のためのGPIB（IEEE 488）インターフェースを提供するものであり、外部装置はIEEE 488コミュニケーションお

よびデータトランスファースタンドに付く。

コントローラーについてのこの好ましい具体例において、2つの外部装置を用いてAPEXに対する電位または電流源とする。Keithley 236 Source/Measure Unit電源86は、正確に調節された電位または電流の源として十分な安定性およ

び柔軟性を提供する。SMU 236は電位を提供し生じた電流を測定し、あるいは電流源を提供し得られた電位を測定する。この装置は、DMA 2800ボードによる GPIB 制御下で Virtual Instrument からプログラムされて、電流または電位レベルおよび時間依存性を制御し、APEX に提供される実際の電位および電流を測定し貯蔵する。

インターフェース 88 中のリレーに配列を通じて電源電流または電位が APEX に適用され、該リレーは独立スイッチングを行い、各電極を無接続とするか、正の電源と接続、または負の電源と接続する。また、好ましい具体例は 1 つまたはそれ以上の Source/Measure サプライを提供し、それは異なるレベルの正および負の電位または電流を異なる電極に供給するために用いられる。リレーの配列は 9 個の 16 チャンネルの Class 3 Relay Modules を伴った National Instrument の SCXI Chassis により提供され、全部で 144 個のリレーが提供される。1 個の電極につき 2 個のリレーを用いて電極を無接続とするか、正の電源と接続、または負の電源と接続する。好ましい具体例において、APEX 装置の結合パッドへのプローブの機械的接触を行う Cerprobe Probe Card を通して、ケーブルの束を介してこれらのリレーを APEX 装置に接続する。

所望によりコントローラーコンピューター 80 は、DNA ハイブリダイゼーション検出のための蛍光励起用照明源 94 を制御する。好ましい具体例において、証明源 94 は、APEX システム 92 中に含まれる蛍光マーカーを励起する適当な波長を出力するレーザーである。

APEX システムのアウトプットを観察経路 96 を経て検出器 98 に通す。観察経路 96 は、例えば光ファイバーを介する物理的接続であってもよく、あるいは例えば顕微鏡を介する光学的経路であってもよい。光学的フィルターを観察経

路中に使用して、APEX システム 92 における蛍光マーカーの放射スペクトルに対応しない波長における検出器の照射を減少させることができる。さらに、必要に応じてノッチフィルター (notch filters) を用いて、レーザー照明源 94 の励起波長における検出器 98 の照射を減少させることができる。所望により、検出器 98 は、例えば冷却 CCD カメラの使用により APEX システム 92 のイ

メージを生じるものであってもよい。光学的イメージの生成のほかに、あるいはこれとは別に、APEXシステムから放射された蛍光をフォトダイオードまたは光電子増倍管のごとき慣用的手段により検出することができる。検出器98のアウトプットをデータプロセッシング/分析システム100に供する。このシステムは、APEXシステム92中の検出プローブ物質のレベルをモニターする。所望により、分析システム100中にエキスパートシステムを用いてもよい。

好ましい具体例において、Data Translation Frame GrabberボードをQuadra 950 NuBusにインターフェースさせて、好ましい具体例において用いられるOptronicsの冷却カラーCCDカメラのごときビデオカメラにより記録されたイメージのメモリーに対する捕捉を行う。APEX配置上の蛍光を可視化する適当なフィルターを装備した顕微鏡を通して、このCCDカメラによりAPEX装置が観察される。

別のシステムも、説明したコントローラーのすべての機能を実行することができるが、プリントされた回路ボード中に含まれる慣例的な装置および装置をプログラムするための同様のユーザーフレンドリーなインターフェースを伴ったボードを制御するための慣例的なソフトウェアを用いることができる。また、これらの代替システムは、能動的でプログラム可能なマトリックスシステムの下にある半導体装置中にリレー配列のスイッチングエレメントを有していてもよい。図8は、能動的でプログラム可能なマトリックスシステムに関する別の具体例の断面図を示す。それぞれのアクセス可能な電極102は支持層104上に形成されている。好ましくは、支持層104は絶縁体である。好ましくは、電極102の上部に浸透層106および個々の電極102に対応した個々の付着層108が配置される。電気的接続110が電極102の後面から支持層104を通して提供さ

れる。さらに、半導体支持体112は、導体110に接続された回路エレメント114を含む。回路エレメント114を半導体112上または中の形成してもよい。回路エレメント114は、導体110を經由して電極102に供給される電圧および/または電流に対する制御を行うことができる。詳細には、回路エレメント114は、好ましい具体例において説明したリレー配列であるスイッチング

エレメントを含んでいてもよい。各回路エレメント114への複数の電流／電圧源ライン116は、異なる電極102に対して異なるレベルを与えることができる。メモリータイプのアドレスライン118は個々の回路エレメント114に対する慎用的な活性化経路を提供する。

励起光を微小位置に導くために、および蛍光シグナルを検出器に導くために導波管を用いることができる。導波管は、光ファイバーのように自立構造であってもよく、あるいは単一体の半導体装置中に統合されていてもよい。電氣的に導体でもある酸化亜鉛またはインジウム酸化するのとき材料から導波管を製造することができる。次いで、導波管を電極および光学的放射伝達手段の両方として用いることができる。非特異的バックグラウンド蛍光を最小にするために導波管を捕捉プローブ平面内または周辺に設置することができる。導波管はホログラフ光学エレメントを含んでいてもよい。これらのホログラフ光学エレメントの機能は、ノッチフィルター、ダイクロイックミラー、バンドパスフィルター、ビームスプリッター、中性フィルター、2分の1波長板、4分の1波長板、偏光子、およびレンズを含むがこれらに限らない。

図9は、能動的でプログラム可能なマトリックスシステムのための別の層状構造の断面図を示す。第1の層中において、個々の電極120が支持体122上に形成されている。好ましくは、支持体122は絶縁体である。好ましくは、電極120の上方に浸透層124および個々の電極120に対応した個々の付着層126が形成されている。光学的経路128は支持体122を通して提供されて電極120にアクセスする。好ましくは、光学的経路128は光ファイバーまたは光伝導性パイプもしくは構造体から構成されている。所望により、電氣的接続130は支持体122を通り電極120に後面からアクセスしている。本明細書

において用語「後面」は、支持体122に接触する電極120の側面を意味するために用いられる。第2の層中において、半導体支持体132は、導体131に接続された回路エレメント133を含んでいる。導体131は、その上部表面が第1の層の後面で導体130の底部と対合し良好な電氣的接触を形成するように設計される。回路エレメント133は、対合した導体131および130を介し

て電圧および／または電流の制御を電極120に提供することができる。詳細には、回路エレメント133は、好ましい具体例において説明したリレー配列のスイッチングエレメントを含んでいてもよい。これらの回路エレメントを複数の電流／電圧源ラインにより供給することができ、メモリータイプのアドレスラインにより活性化することができる。所望により、検出器エレメントが第1の層の付着部位126におけるDNAハイブリダイゼーションをモニターするように、フォトダイオードのごとき検出器エレメント134が半導体層132中に含まれていてもよく、光学的経路135を通して第1の層の光学的経路128に連結されていてもよい。これらの光学的経路は光ファイバー経路または導波管として作用することができ、上記の種々の光学的エレメントを含むことができる。所望により、試料封入容器136を当該構造周囲に配置して分析または試験される生物学的材料を含むようにしてもよい。所望により、流動体導入ポート137またはのぞき窓138を装備してもよい。生物学的封入構造136および所望により存在してもよいポート137および138を、上記の能動的でプログラム可能なマトリックスシステムのいずれかと関連づけて使用してもよい。

図10は、能動的でプログラム可能なマトリックスシステムのためのマウンティングシステムの透視図を示す。図3および図4に示すような構造を用いてシステム140をチップ上に形成してもよい。チップ140は結合ワイヤーによって接触パッドおよび(図3)チップ受け144の接続パッド142間に接続されている。好ましくは、チップ受け144は個々のピン147を含み、ピンは、パッド142を介して結合ワイヤー146へ、そして140上への電氣的接続を提供する。ピン147は、制御システムに接続されたソケット148と対合している。

微小位置の能動的でプログラム可能なマトリックスを毛細管から形成すること

もできる。図17はシステムおよびそこから生じた生成物を示す。毛細管を重ねて任意の幾何学的配列220とすることにより、あるいはヒーター222により溶かし、例えば押し型224によりこれらの配列220を付着および統合ユニット226中へと引っ張ることにより毛細管マトリックスを形成する。別法として

、互いに同心円状態に配置された2種の異なる材料から構成された固体棒を毛細管のかわりに使用することもできる。図18はかかる構造を透視図で示す。ここに、内部コア230を構成する材料は外部材料234から選択的にエッチングされて、装置に部分的または全体的に通じる穴232を形成する。別法として、多孔性度を調節されたガラスを形成するようなやり方で内部コアをエッチングしてもよい。

毛細管中に挿入されたワイヤーにより、あるいはリソグラフィ的に形成された電極の相補的マトリックスに毛細管マトリックスを付着させることにより個々の毛細管にアドレスすることができる。さらに、固体棒の内部コアを導体材料から形成してもよい。電極の相補的マトリックスに固体棒マトリックスを付着させることにより、あるいは固体棒マトリックス上のリソグラフィ的に形成された電極により、内部コア材料との電氣的接触を行うことができる。

毛細管毛細管およびエッチングされた固体棒を適当な材料で満たして浸透層を形成する。浸透層表面を特殊な付着化学薬剤で機能化することができる。

電気泳動的輸送のための別法は、微小位置に物質を輸送するための対流物質移動の使用である。これを行うことのできる1の装置は回転ディスクである。ここで、対流は、回転ディスクおよび溶液の間の境界に存在する流体力学的剪断力により行われる。流体はバルク溶液から表面上へとまっすぐに流れる。電極パッドのマトリックスは回転ディスクに付いていてもよく、あるいはマトリックス中の各電極が個別のディスクに付いていてもよい。後者の場合、対流物質移動各電極は選択的にアドレスされうる。対流物質移動によりパッドがアドレスされた後、電気泳動的輸送を用いて所望でない物質を除去するために電極を使用することができる。

能動的でプログラム可能なマトリックスシステムを形成する好ましい方法を図11A-Gに記載する。好ましくは、p型の試験グレードのシリコンの半導体

150は、その上に形成された厚い(10000Å)の酸化物152を有する。図11Bは酸化物層152上に形成された金属層154を示す。好ましくは、アルミニウム、金、白金、パラジウム、チタン/タングステンからなる群より金属

を選択する。半導体ポリシリコンを金属のかわりに用いてもよい。図11Cは酸化物層152上に形成されたパターン化アルミニウム156を示す。光リソグラフのごとき慣用的リソグラフ法により金属をパターン化することができる。

図11Dは、TEOSのごときガラスのオーバーコートに伴う図11Cの構造を示す。好ましくは、TEOSをPECVD法により形成する。好ましくは、ガラスを比較的高温、例えば475℃にて形成して金属層156への付着を促進する。次いで、TEOS層158を窒化物層160でオーバーコートする。好ましくは、パターン化された電極領域156上方の領域にて窒化物層160およびTEOS層158をエッチングする。これにより、パターン化された電極156に直接接触できる窓162が形成される。

図11Gは、アミノプロピルシレン (APS) に構造物全体を曝した結果を示す。APS 164はパターン化された金属層156に付着し、窒化物層160には付着しない。APS層はDNA捕捉プローブ用付着層として役立つ。

図12は、ポリシリコンが通常の金属コンタクトのかわりに用いられている別の構造を示す。構造は図11Fの構造と同様であるが、アルミニウム層156のかわりにポリシリコン層166を含む。好ましい工程の配列は以下のごとし。まず、好ましくはp型の試験グレードのシリコン半導体を厚い(10000Å)酸化物で酸化する。導電性ポリシリコン層、好ましくは厚さ5000Åに塗布されたポリシリコン層を形成する。次いで、好ましくは湿エッチングを用いる光リソグラフによりポリシリコンをパターン化する。次に、PECVD付着TEOSのごときガラス層を形成する。475℃で形成された約3000Åの層が付着改善に好ましい。次いで、好ましくは湿エッチングを用いる光リソグラフによりガラス層を再度パターン化する。次いで、好ましくはアルミニウムを厚さ3000Åに蒸着させることにより金属層を表面上に形成する。次いで、金属を好ましくは湿エッチングを用いる光リソグラフによりガラス層を再度パターン化する。次に、

好ましくは70℃でPECVDにより厚さ3000Åの窒化物層を形成する。次に、湿エッチングを用いて、光リソグラフにより電極への接触を行うための窓を



形成する。

図13は、チタングステンのごとき中間付着性金属の使用による、下に存在している絶縁体層への金属導体の改善された付着を有する構造を示す。半導体170、好ましくはシリコンは酸化物172をその上に有している。金またはアルミニウムのごとき導電性金属から形成された中間電極層176が、チタングステン174および178の間に挟まれている。付着性金属層178は、好ましくは白金から形成された外部電極184に接触している。例えばTEOSから形成されたガラス層180が外部窒化物コーティング182の下に存在している。

図14は、改良された電極配置の断面図である。電極190は絶縁体192、好ましくは酸化物に隣接して配置されている。窒化物層194は絶縁層192を覆っている。好ましくは、絶縁層192が窒化物層の端198から下がったところに設置されるように窒化物層194が切り取られている。そのことにより、切り取られた領域を含まない同様の構造よりも大きな体積を有するリサーバー196ができる。

図14に示された構造を用いて、浸透層を形成する材料のプラグを機械的に保持する。張り出した層は浸透層を捕捉する。この設計を任意の数の張り出した層について一般化して、例えばミツバチの巣型の減少する同心円を形成するか、あるいは種々の半径の同軸ディスクの隙間を有するようにすることができる。

浸透層（例えば、図2の層14）を、炭素鎖ポリマー、炭素-ケイ素鎖ポリマー、炭素-燐鎖ポリマー、炭素-窒素鎖ポリマー、ケイ素鎖ポリマー、ポリマーアロイ、層状ポリマーコンポジット、相互貫入ポリマー材料、セラミックス、調節された多孔性度のガラス、ゾルーゲルとして形成された材料、エーロゲルとして形成された材料、ヒドロゲルとして形成された材料、多孔性グラファイト、粘土またはゼオライトのごとき材料（これらに限らない）から形成することができる。

浸透層は結合物質を電極表面から分離する。微小リソグラフ法および微小機械

加工法を用いて微小位置を形成する。微小位置および微小位置上のポリマー層の

表面の化学的修飾を用いて表面機能性に関する特別な付着部位を作る。

メッシュタイプの浸透層はランダムなポリマー分子配列を含んでおり、それらは架橋度により決定される平均孔サイズを有するメッシュ様構造を形成する。我々は、アクリルアミドをモノマーとして含有するいくつかのポリマー化可能な処方を用いるメッシュタイプの浸透層の形成を示した。我々は、トリエチレングリコールジアクリレート、テトラエチレングリコールジアクリレートおよびN,N'-メチレンビス-アクリルアミドを架橋剤として用いた。分子量330キロダルトンおよび25キロダルトンのポリ-1-リジンをアクリルアミド/コポリマー処方中に混合して特別な機能性を浸透層表面に付加するための手段を得た。混合物を微小位置表面上に乗せた。次いで、紫外線により光ポリマー化した。いくつかの場合、Au14をフォトイニシエーター (photoinitiator) として添加した。ポリマー処方は、水および非水溶媒、メタノール、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、アセトン、およびこれらの溶媒の混合物から作られた。

DNA捕捉プローブに結合した酸化リボヌクレオシドとポリ-1-リジンの1級アミンとの間のシフ塩基反応によりDNA捕捉プローブを浸透層表面に結合させた。これにより浸透層表面への特別な機能性の共有結合の証拠が得られる。

電気泳動的輸送により酸化されたDNA捕捉プローブを微小位置表面にもって来た。捕捉プローブを蛍光マーカーで標識した。このことにより電気泳動的輸送による微小位置へのアドレス可能性が示される。

蛍光マーカーを付した酸化された捕捉プローブは、電気泳動的輸送により、微小位置の浸透層表面に引き付けられた。機械的手段により浸透層を微小位置から除去した。蛍光標識された捕捉プローブの存在についての証拠は得られなかった。これにより、電極表面からDNAを保護する浸透層の能力が示された。

浸透層で修飾されていない金の微小位置に現れた最大DC電流密度は、水の加水分解による気泡が生じる前において8ミリアンペア/cm<sup>2</sup>であった。アクリルアミドに基づく浸透層により修飾されていない金の微小位置に現れた最大DC電流密度は、水の加水分解による気泡が生じる前において40ミリアンペア/cm<sup>2</sup>であった。このことにより、H<sub>2</sub>Oの加水分解のために気泡が生じる前に

ける最大アクセス可能電流密度を上昇させる浸透層の能力が示される。

イオノマーサンドイッチ浸透層が1またはそれ以上の高分子電解質のラミナから形成される。高分子電解質層は同じ電荷、異なる電荷、モザイク構造の電荷を有していてもよい。

2層イオノマーサンドイッチ層を、ペルフルオロ化スルホン酸高分子電解質（ナフィオン（Nafion））の基材層およびポリ-1-リジンの上層から形成した。基材ナフィオン層を微小位置上に置き、乾燥した。次いで、この基材層を1重量%のポリ-1-リジン水溶液に曝した。カチオン性のリジンに基づくポリマーはアニオン性ナフィオン基材層に強力に吸着する。ポリ-1-リジン層は、シフ塩基反応により、浸透層表面への酸化されたDNA捕捉プローブの付着を可能にする。ナフィオン基材層はアニオン性であり、DNAのごとき負イオンに対して選択透過性である。

図15は、グラフによるユーザーインターフェースの例を示す。ウィンドウ200はディスプレイの全体像を示す。登録情報202が提供される。能動的でプログラム可能なマトリックスシステムの種々のパッドが長方形の座標軸システムにより同定される。ディスプレイ204はそれぞれ、各パッドについての電氣的パラメーター、例えば電流または電圧を示す。ボックス204Aはパッド（3, 4）に関して電流を時間の関数として示し、ここに電流は時間の関数として変化し、適用過程において2方向に変化している。ボックス204Bはパッド（3, 5）を示し、示された時間においては電流を適用されていない。ボックス204Cはパッド（4, 4）に関して時間とともに変化する電流を示し、ここで電流は、ボックス204Aにて報告されているパッド（3, 4）と比較すると電流の時間が遅れている。ボックス204Dはパッド（4, 5）を示すが、電流は時間の関数として適用されていない。ボックス204Eはパッド（1, 1）を示し、電圧は一定の負のDC値である。ボックス204Fはパッド（3, 4）に関して電圧を時間に対する関数として示し、より負のDC値を有している。すべての場合において、ボックスはプログラムされた電流または電圧を点線で、測定さ

れた電流または電圧を実線で示す。

上記の本発明の好ましい具体例および別の具体例のほかに、いくつかの別法が可能である。例えば、DCバイアス電圧または電流を同時に適用している間に、頃合いを見計らってイオン移動を引き起こす電場を変化させてもよい。DCバイアス電圧または電流に上乗せされたACシグナルを用いることにより以下の3つのことを行うことができる。1) 非特異的に結合したDNAによるバックグラウンドを最小化する、2) 制御変数が交番電流または電圧の周波数である場合に、電子的な厳密性の制御手段を提供する。3) DNA分子を空間的に整列させる手段を提供する。

ハイブリダイゼーションしたDNAの蛍光による検出のための多くの別法が存在する。やはり大部分の別法は、検出可能シグナルを生じるレポーター基での捕捉または標的またはレポーターDNAプローブの修飾を包含する。純粋に物理学的方法に基づいているこれらの方法のうち少数のものはレポーター基を必要としない。これらの別法を以下の目録に示すことができる：(1) 蛍光、時変調蛍光、蛍光消失変調、偏光選択的蛍光、吸光、鏡面光沢度、屈折率変化、円二色性測定、表面プラズモン共鳴検出、化学発光、スペckル干渉測定および磁気光学的カー効果を包含する線形光学的方法；(2) 第二高調波発生、第三高調波発生、パラメトリックミキシング、光ヘテロダイン検波、フェーズコンジュゲーション、ソリトンダンピングおよび光学的カー効果を包含する非線形光学的方法；(3) 微分スキャンニング熱量測定、多周波の微分スキャンニング熱量測定、および微分別分析を包含する熱影響に基づく方法；(4) 結晶微量天秤、カンチレバー微量天秤、表面音波および表面ラブ波を包含する質量変化に基づく方法；(5) 電流測定、電荷測定、電圧測定、電気化学発光、供与体-受容体複合体における電荷移動および表面インピーダンス分光法を包含する電気化学的方法；および(6) 標識基を用いる放射活性検出法。

明確化および理解の目的で図面および例を用いてある程度詳細に上記発明を説明したが、添付した請求の範囲の精神または範囲から離れることなく本発明について変更および修飾を行いうるという本発明の教示を考慮すれば本発明は容易に

当業者に明らかとなろう。

【図1】

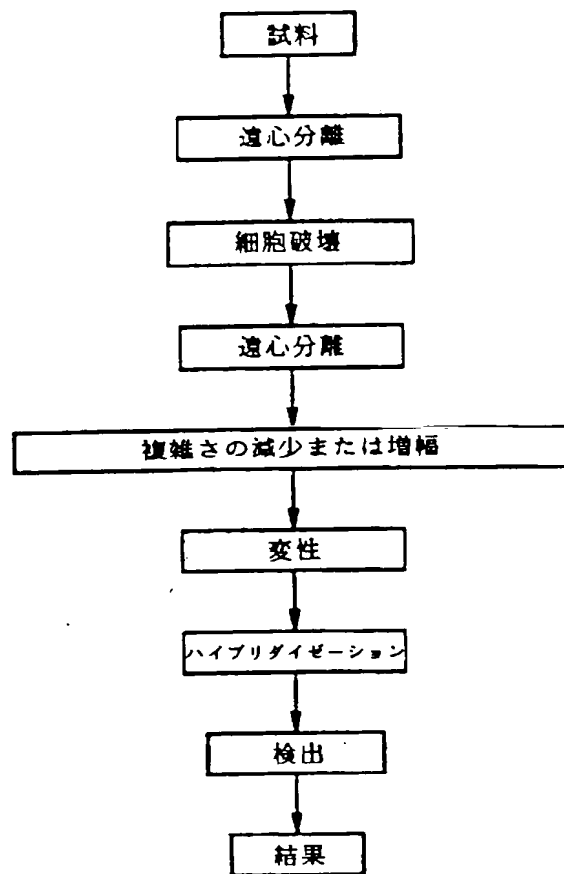


FIG. 1

【圖2】

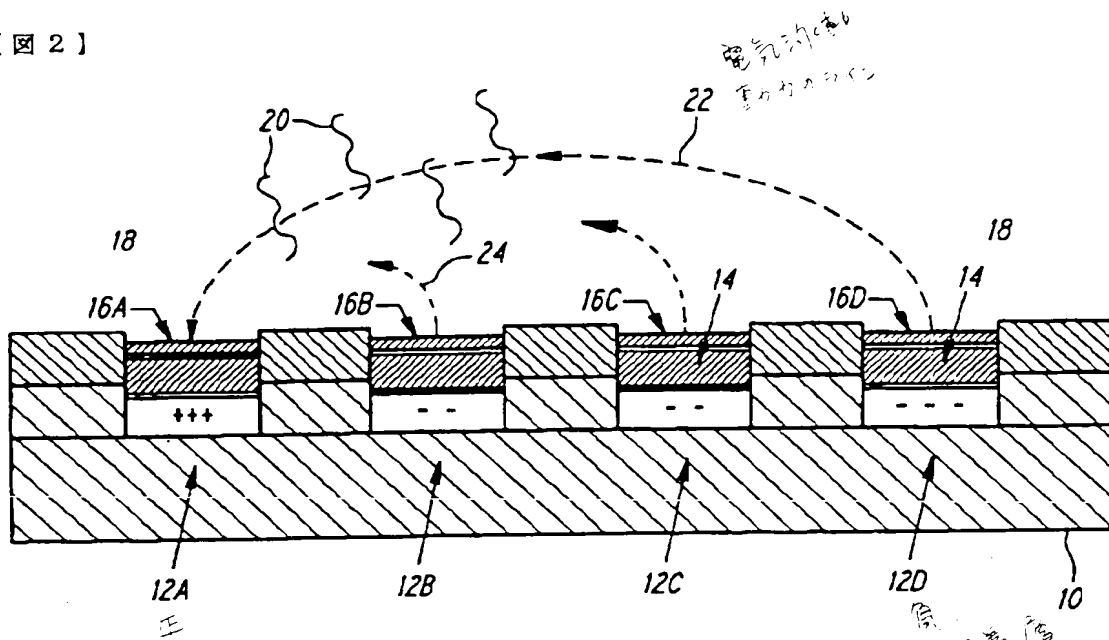


FIG. 2A

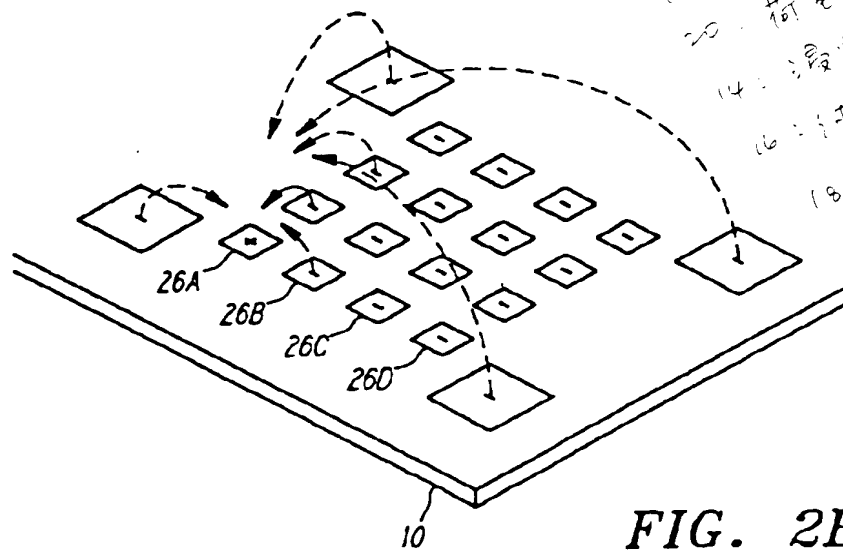


FIG. 2B

10: 基板  
 12: 電極  
 14: 絕緣層  
 16: 非特異的結合物質  
 18: 溝槽  
 20: 荷電結合物質  
 22: 電極  
 24: 絕緣層  
 26: 非特異的結合物質  
 28: 溝槽  
 30: 荷電結合物質  
 32: 電極  
 34: 絕緣層  
 36: 非特異的結合物質  
 38: 溝槽  
 40: 荷電結合物質  
 42: 電極  
 44: 絕緣層  
 46: 非特異的結合物質  
 48: 溝槽  
 50: 荷電結合物質  
 52: 電極  
 54: 絕緣層  
 56: 非特異的結合物質  
 58: 溝槽  
 60: 荷電結合物質  
 62: 電極  
 64: 絕緣層  
 66: 非特異的結合物質  
 68: 溝槽  
 70: 荷電結合物質  
 72: 電極  
 74: 絕緣層  
 76: 非特異的結合物質  
 78: 溝槽  
 80: 荷電結合物質  
 82: 電極  
 84: 絕緣層  
 86: 非特異的結合物質  
 88: 溝槽  
 90: 荷電結合物質  
 92: 電極  
 94: 絕緣層  
 96: 非特異的結合物質  
 98: 溝槽  
 100: 荷電結合物質

【图3】

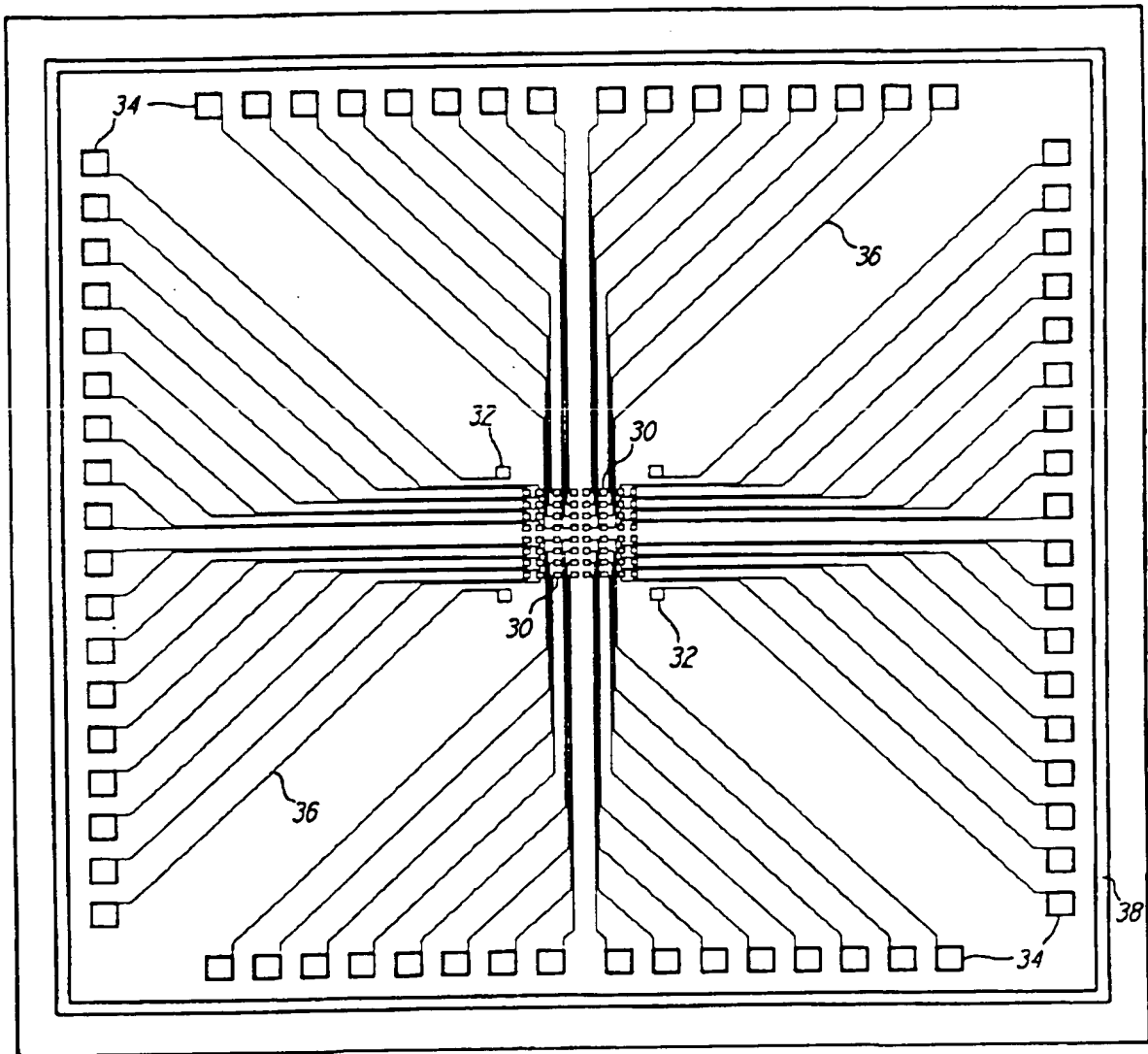


FIG. 3

【圖4】

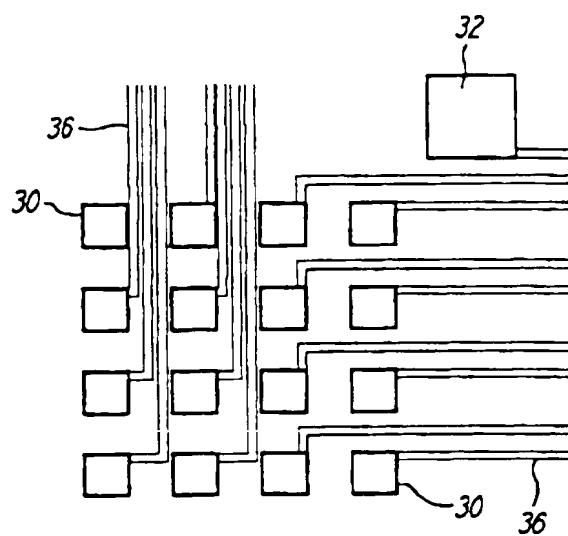


FIG. 4

【圖5】

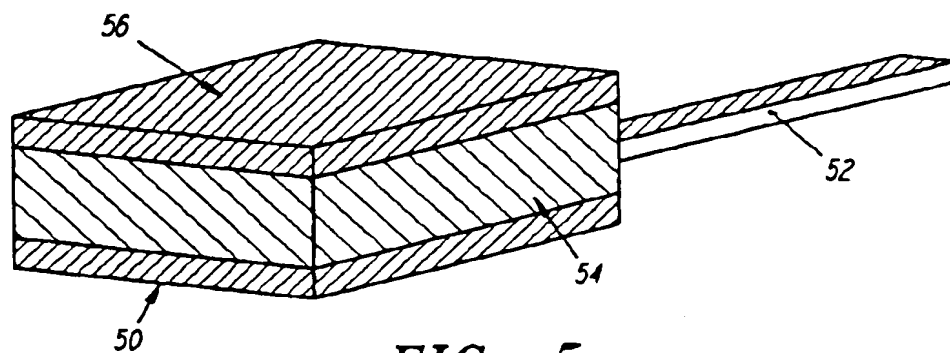


FIG. 5



【図6】

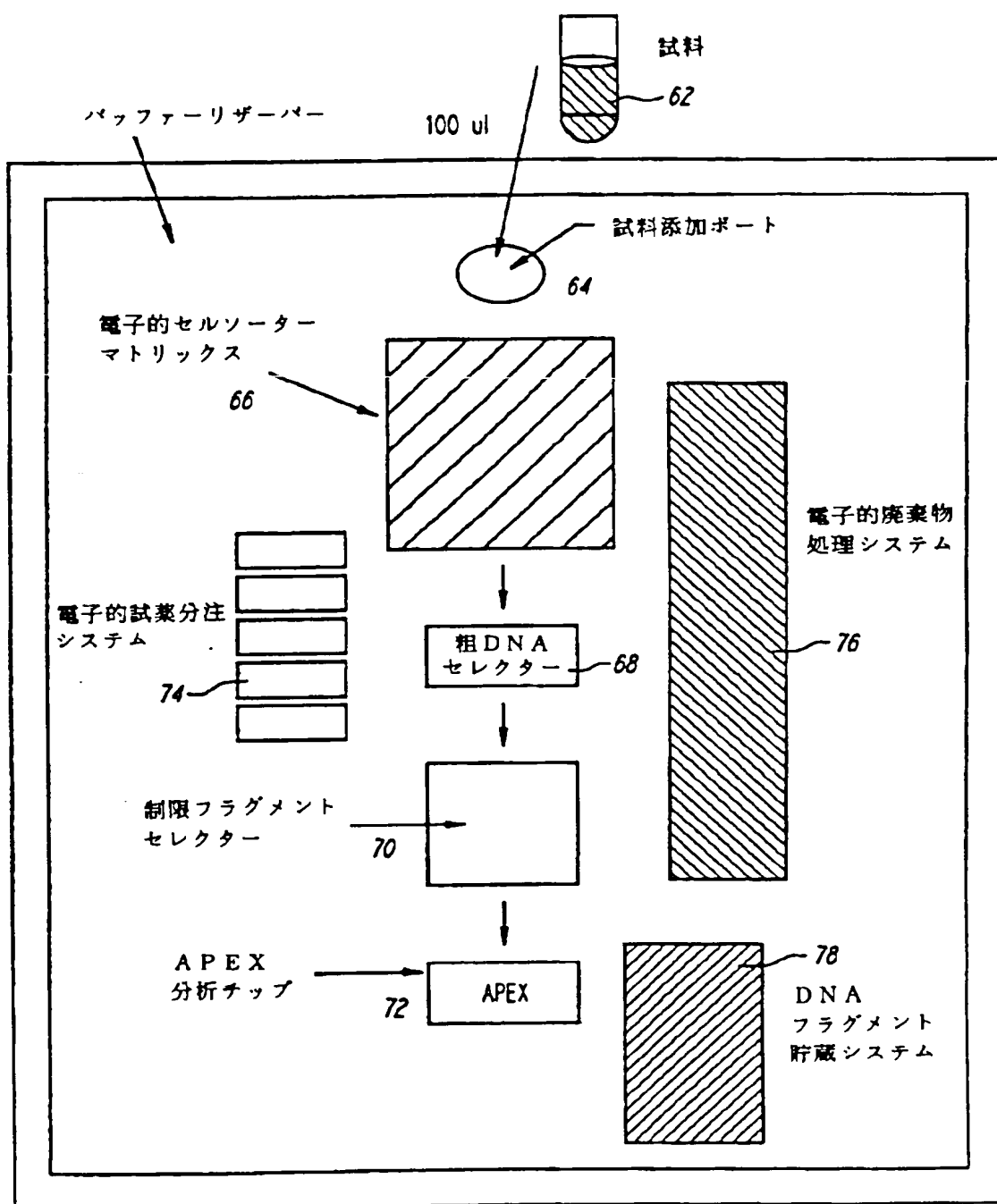


FIG. 6

【図7】

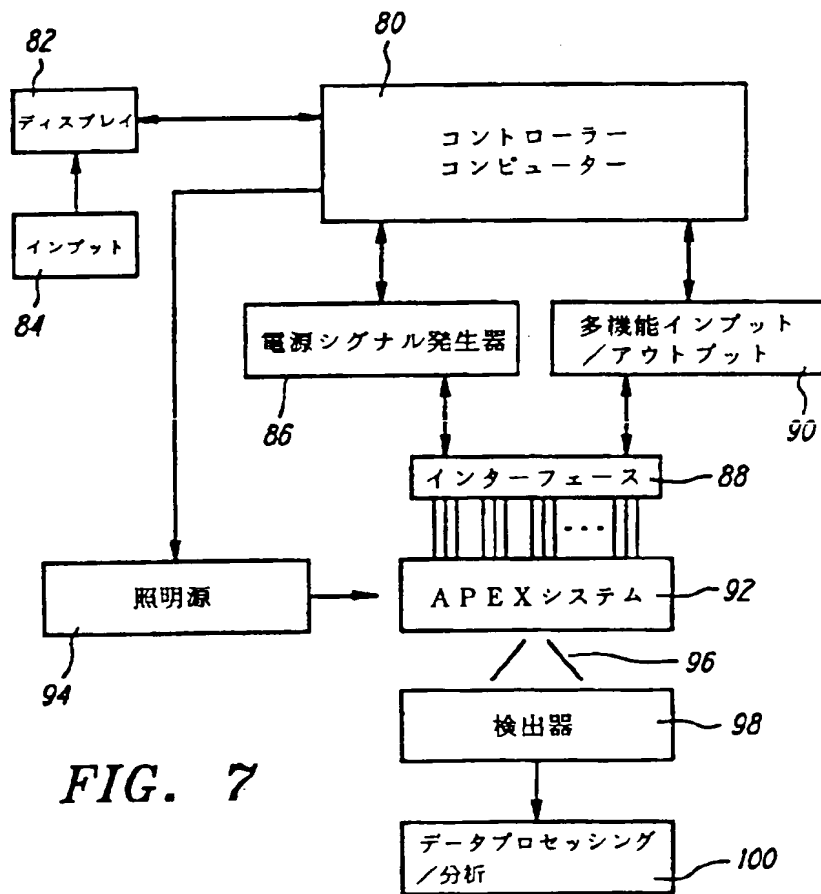


FIG. 7

【図8】

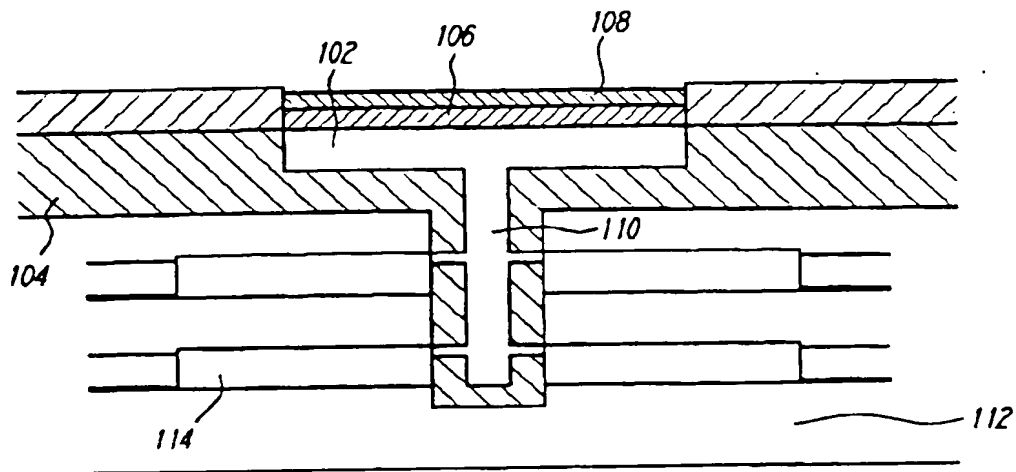


FIG. 8

【図9】

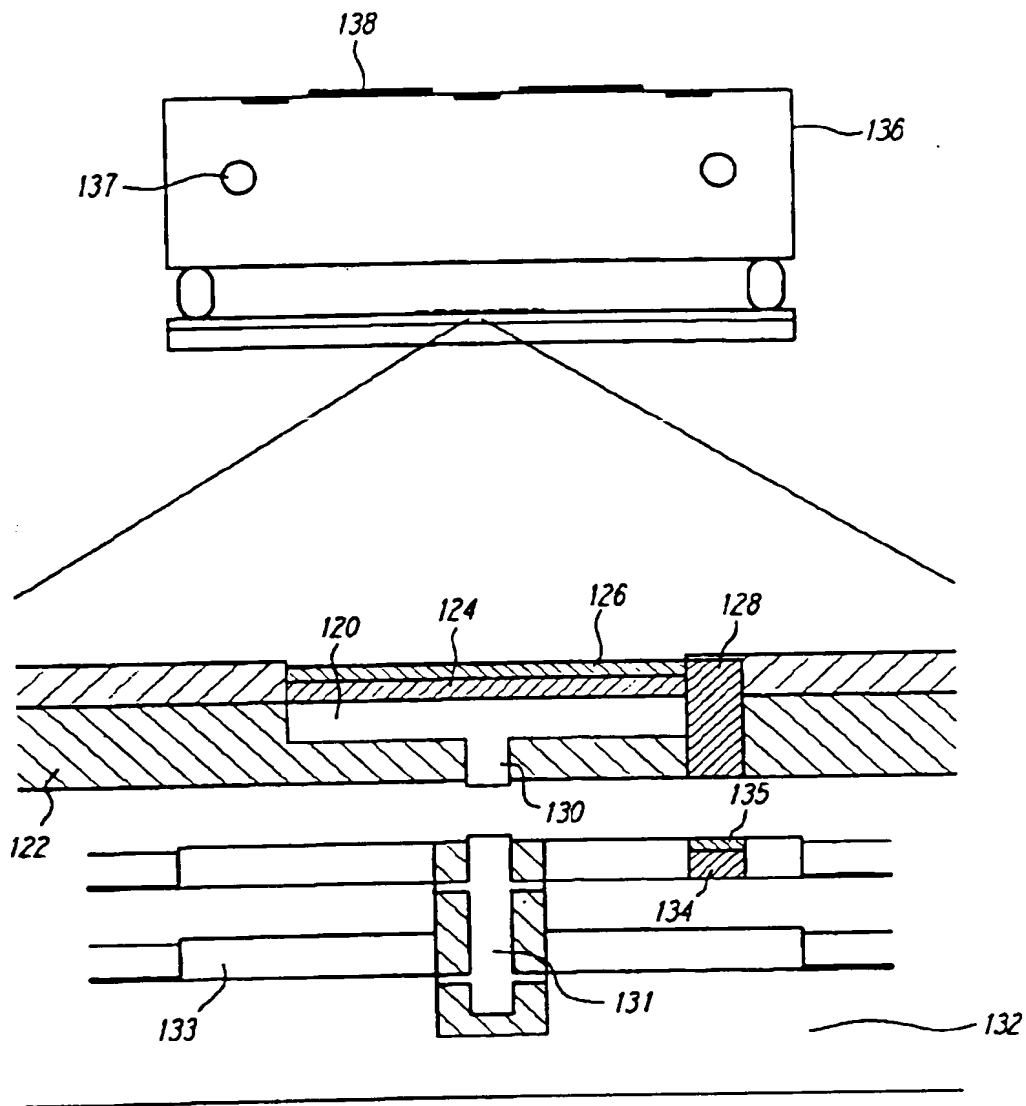


FIG. 9

【図10】

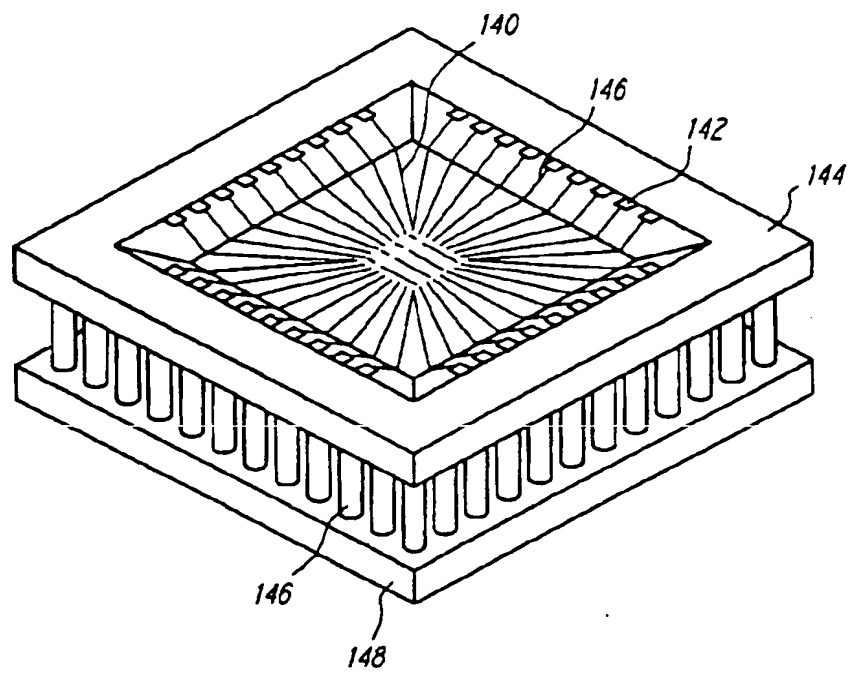
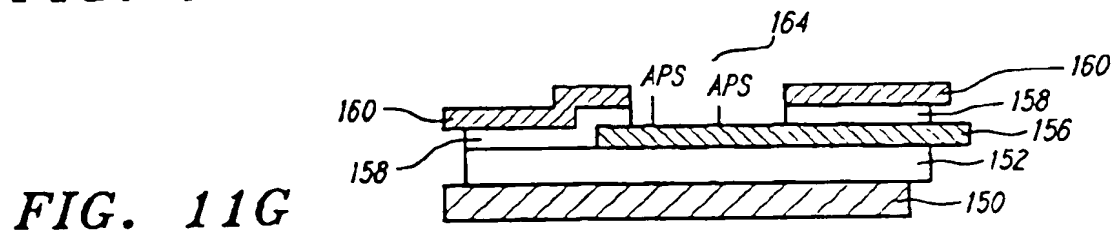
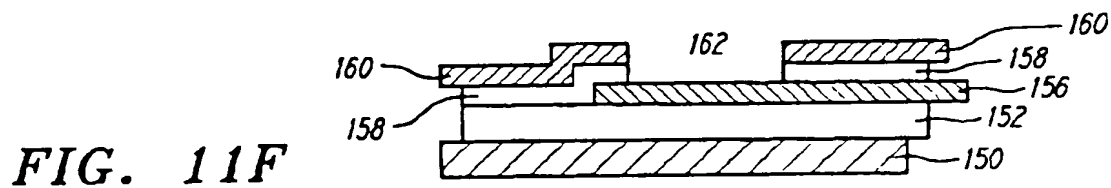
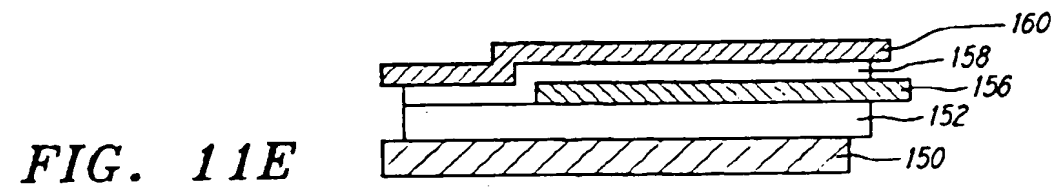
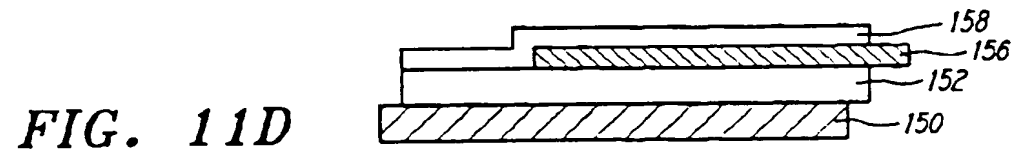
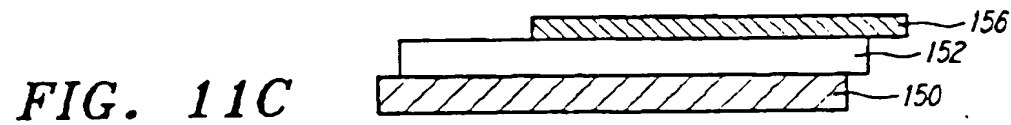
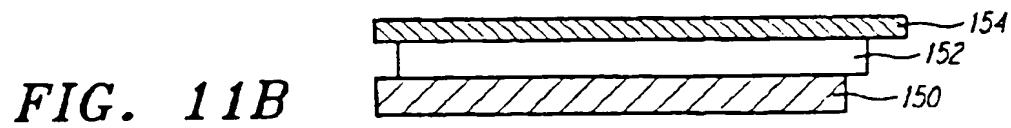
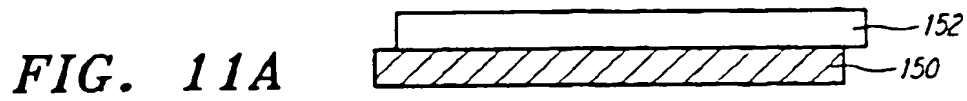
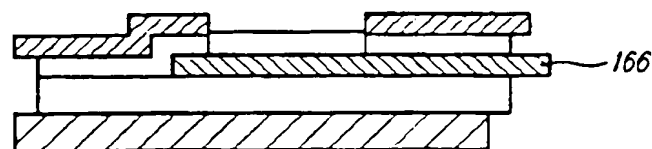


FIG. 10

【圖 11】



【圖 12】

**FIG. 12**

【図13】

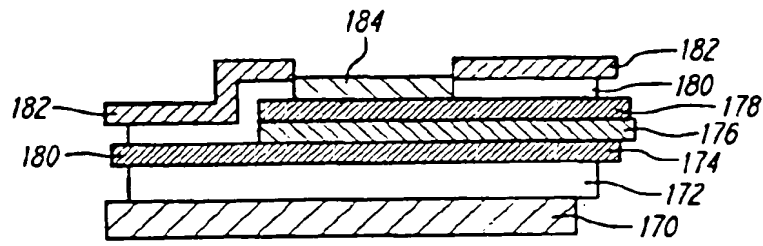


FIG. 13

【図14】

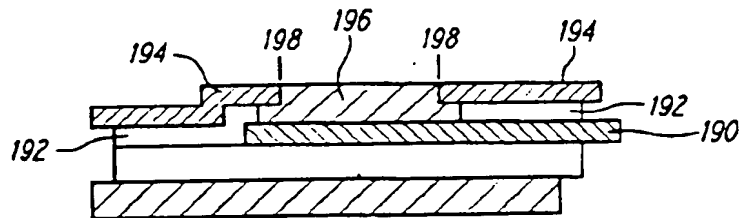


FIG. 14

202

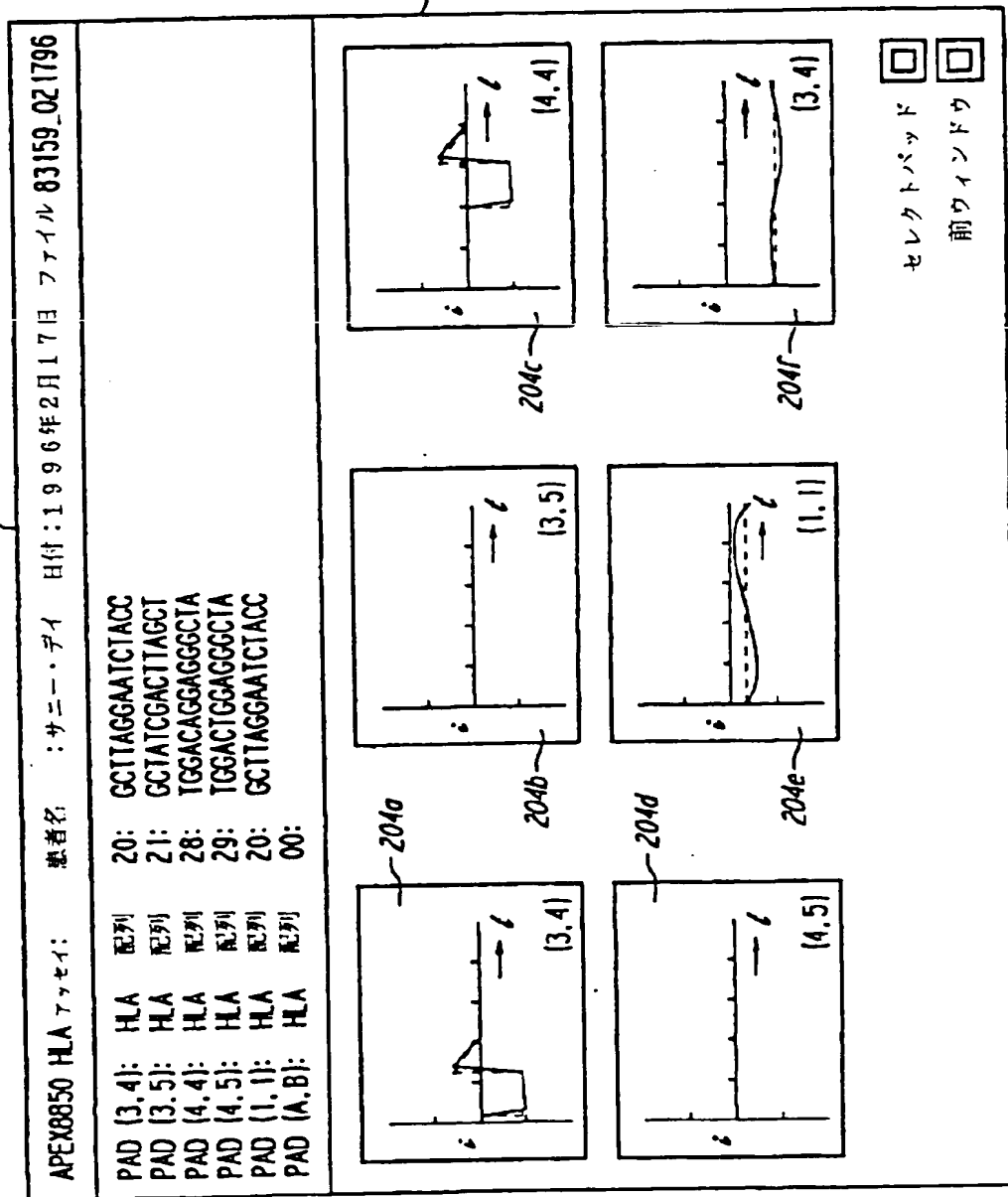


FIG. 15

【図16】

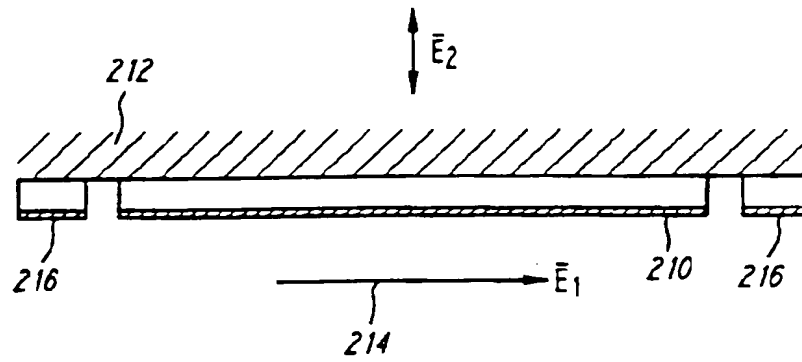


FIG. 16

【図17】

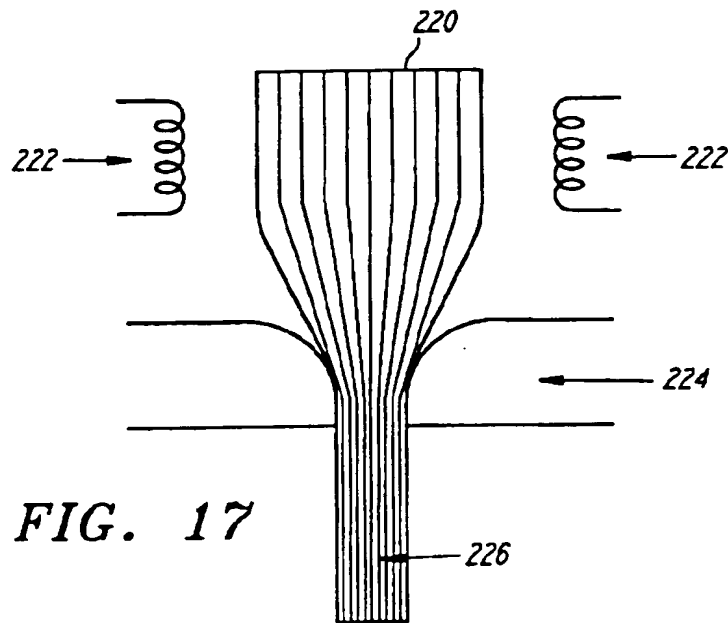
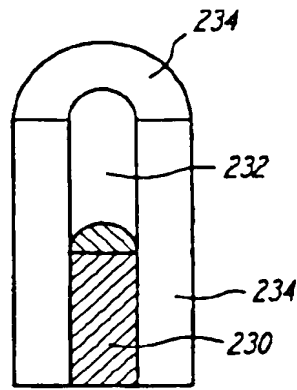


FIG. 17



【図18】

*FIG. 18*

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/11333

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : 001N 35/00; C12P 19/34; C12M 1/00 US CL : 422/50; 435/91.1, 287 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 422/50, 52, 55, 58, 62, 63, 68, 1, 69, 82, 01, 82, 05, 82, 06, 82, 07, 82, 08, 82, 09, 82, 11, 98; 435/6, 7, 191, 1, 91, 2, 287, 536/22, 1, 25, 3; 935/77, 78, 88 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CAS, BIOSIS, MEDLINE, WPI, and BIOTECH ABS search terms: device, microchip, biochip, reaction, PCR, assay, permeable, multiple, array		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US, A, 5,234,566 (OSMAN ET AL.) 10 AUGUST 1993, see especially the abstract, the Figures, Example 5, and claims 1-38.	1-10, 13-31, 36-40, 43, 49-54 ----- 11, 12, 41, 42, 44-48
X --- Y	US, A, 5,118,605 (URDEA) 02 JUNE 1992, see especially the Figures and the DESCRIPTION OF THE SPECIFIC EMBODIMENTS in columns 3-15.	32-34 ----- 35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 DECEMBER 1995		Date of mailing of the international search report 03 JAN 1996
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Ardin Marschel</i> ARDIN MARSCHEL Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US95/11333

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US, A, 5,200,051 (COZZETTE ET AL.) 06 APRIL 1993, see especially the abstract; Figures 4 and 8B and related discussion; column 18, lines 1-2; and column 26, lines 8-10.	1-10,13-31,36-40,43, 49-54  11,12,41, 42,44-48
Y	US, A, 5,096,669 (LAUKS ET AL.) 17 MARCH 1992, see the entire disclosure and especially claims 1-33.	9-13,17-31,36-54
X — Y	US, A, 5,096,807 (LEABACK) 17 MARCH 1992, see especially the abstract, the Figures, and the discussion related to the Figures.	36,40,41, 43  1-31,37,42,44-54
X — Y	US, A, 5,227,265 (DEBOER ET AL.) 13 JULY 1993, see especially the abstract, the Figures, and the discussion related to the Figures.	36,40,41, 43  1-31,37,42,44-54
X, P — Y, P	US, A, 5,304,487 (WILDING ET AL) 19 APRIL 1994, see especially the abstract, Figures, and claims 1-26.	32,36,40, 41,43- 49,51,52,54  1-31,33-35,37-39,42, 50,53

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/11333

## BOX II OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-17, drawn to electrodes with a contacting layer limitation.

Group II, claims 18-31, drawn to systems for controlling electrodes.

Group III, claims 32-35, drawn to DNA complexity reduction methods.

Group IV, claims 36-54, drawn to systems without attachment layer but not limited to a contacting layer on electrodes.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The four groups lack a common special technical feature that links any two or more groups. Group I is directed to a device with a support, plurality of self-addressable electrodes with a contacting portion, and individual electrical connections. Such electrodes with a contacting portion are not a limiting feature of any of Groups II-IV. Group II is directed to a control system with a controller, input system, generator, and interface which may be utilized with a wide variety of devices wherein the devices are not limited as given in the invention of Group I nor components of the system of Group IV. Group III is directed to DNA complexity reduction but is not limited to any device practice whatsoever and thus lacks any of the special technical device type features of Groups I, II, or IV. The electrophoretic force limitation of claim 35 in Group III is also not related to any device limitation of said Groups I, II, or IV. Lastly, Group IV has been noted above as lacking a special technical feature in common with each of Groups I-III. It is noted that the systems of Group IV are limited to containing devices with a plurality of separately addressable electrodes but that these electrodes are not described as self-addressable as in Group I and are thus not a common special technical feature as compared to the invention of Group I.

---

フロントページの続き

- (72)発明者 モンゴメリー、ドナルド・ディ  
アメリカ合衆国92103カリフォルニア州  
サンディエゴ、ウエスト、ペンシルベニ  
ア・ナンバー315、836番
- (72)発明者 バトラー、ウィリアム・エフ  
アメリカ合衆国92009カリフォルニア州  
カールスバッド、カロマ・サークル7577番